SACCHAROMYCES ANAMENSIS,

DIE HEFE DES NEUEREN AMYLOVERFAHRENS.

MIT EINER EINLEITUNG:

ÜBER DAS AMYLOVERFAHREN.

VON FRANZ HEINRICH.

SACCHAROMYCES ANAMENSIS, die Hefe des neueren Amyloverfahrens.

Mit einer Einleitung:

Über das Amyloverfahren.

Von der
Kgl. Technischen Hochschule zu München
zur Erlangung der Würde eines Doktors
der technischen Wissenschaften (Doktor-
:: Ingenieurs) genehmigte Dissertation. ::

ACAD. LAND. BAT. BIBL.

Vorgelegt von
Dipl.-Landw. **Franz Heinrich**
aus Weißenhorn (Bayern).

Referent:
Prof. Dr. Carl J. Lintner.

Korreferent:
Prof. Dr. Karl Giesenhagen.

Tag der Annahme der Dissertation: 16. Dezember 1912.

Druck von J. Schneck, Geisenheim.
1913.

Dem Andenken meiner teuren Mutter,
meinem Vater in Liebe und Dankbarkeit
gewidmet.

Die vorliegende Arbeit wurde zum grössten Teile im physiologischen Laboratorium der Wissenschaftlichen Station für Brauerei in München unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Will durchgeführt. Es ist mir eine angenehme Pflicht, meinem hochverehrten Lehrer an dieser Stelle für das mir stets entgegengebrachte Wohlwollen und die reichliche Unterstützung meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Besonders zu Dank verpflichtet bin ich ferner Herrn Prof. Dr. M. Büchele r-Weihenstephan, von dem ich die erste Anregung bekam, mich mit dem behandelten Gebiete zu beschäftigen. Er hat mir in dankenswerter Weise die als Ausgangsmaterial benützten Pilz- und Hefekulturen durch die Sprit-Automatenbau-Gesellschaft zu Köln a. Rh. (Vertreterin der Amylogesellschaft in Deutschland) zugänglich gemacht und meine Arbeiten mit größtem Interesse verfolgt. Ebenso schulde ich Dank Herrn Dr. M. Rüdiger-Weihenstephan, dem ich wertvolle Anregungen und Auskünfte über die Technik des Amyloverfahrens verdanke und der den kleineren, im brennereitechnischen Laboratorium der Königl. Akademie Weihenstephan ausgeführten Teil meiner Arbeiten überwachte.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546317_0041

Inhalts-Verzeichnis.

Seite

Einleitung: Geschichte der Pilzverzuckerung 9
Das Amyloverfahren 14
Die beim Amyloverfahren verwendeten Organismen . . . 24
Rhizopus Delemar 24
Levure anamite 26
A. Allgemeines 26
B. Morphologie 27
I. Sporenbildung 27
II. Hautbildung 34
III. Wachstumserscheinungen in Nährflüssigkeiten und auf festen Nährböden 38
1. Wachstumserscheinungen in Nährflüssigkeiten . 38
a) Tröpfchenkulturen 38
b) Wachstumserscheinungen in größeren Mengen von Nährflüssigkeiten 40
2. Wachstumserscheinungen in und auf festen Nährböden 43
a) Einzellkulturen 43
b) Stichkulturen 43
c) Kulturen mit gleichmäßiger Verteilung der Hefe in Gelatine 44
d) Riesenkolonien 44
C. Physiologie 50
I. Generationsdauer 50
II. Gärversuche 51
1. Kleingärmethode 51
2. Gärversuche im Großen mit Milchzucker . . 52
3. Vergärungsgrad 54
4. Gärverlauf 56
a) In gehopfter Bierwürze 56
b) In Maismaische 57
5. Gärungsform (Ober- oder Untergärung ?) . . 61
III. Assimilation in mineralischen Nährlösungen . . 61
1. Kohlehydrate 61
2. Alkohole 64
VI. Wachstumsgrenzen bei hoher und niedriger Temperatur 65
V. Widerstandsfähigkeit gegen Erhitzen 66
VI. Entwicklungshemmung und Abtötung durch verschiedene Alkohole 67
VII. Gelatineverflüssigung 69
VIII. Glykogenbildung 69
D. Zusammenfassung 70

Einleitung.

Geschichte der Pilzverzuckerung.

Unter Pilzverzuckerung versteht man den Ersatz des bei uns zur Verzuckerung von Stärke gebrauchten Malzes durch gewisse Schimmelpilze, die in ihrem Myzel stärkeverzuckernde Enzyme zu produzieren vermögen. Es war in Europa bis vor verhältnismäßig kurzer Zeit kaum bekannt, daß solche „amylolytisch“ wirkenden Pilze existieren und sogar für technische Zwecke in Betracht kommen. Erst in den Jahren 1874 und 1876 machten Hoffmann[7]) und Korschelt[10]) auf Grund ihrer Forschungen über die bis dahin bei uns fast unbekannte japanische Sakébrauerei auf diese interessante Tatsache aufmerksam. Seit dieser Zeit vermehrten sich die Publikationen über die fraglichen Pilzgruppen rasch, eine ganze Anzahl neuer derartiger Produzenten amylolytischer Enzyme wurde entdeckt sowie Verfahren beschrieben, in denen sie eine Rolle spielen. Wir kennen heute schon eine recht stattliche Anzahl solcher Schimmelpilze, von denen allerdings die meisten keine Bedeutung für die Praxis haben, einzelne aber bei Herstellung alkoholischer Getränke aus stärkehaltigen Rohstoffen einen ganz hervorragenden Anteil nehmen. Solche Rohstoffe werden, wenn sie von verzuckerndem Pilzmyzel durchwuchert sind, als „Pilzmalz“ bezeichnet.

In Bezug auf ihre Stellung im System gehören die genannten Pilze zum kleineren Teil der Gattung *Aspergillus*, zum weitaus größeren Teil der Gattung *Mucor* an. In mehr oder minder großem Maße kommt ihnen allen die Eigenschaft zu, Enzyme aus der Gruppe der Diastasen zu erzeugen. Sie besitzen eine ähnliche Wirkung wie Malz, indessen entzieht es sich vorläufig unserer Kenntnis, wie weit die Pilzenzyme wirklich identisch sind mit solchen des Malzes, mit denen sie in ihrem Verhalten namentlich hinsichtlich der verflüssigenden Wirkung

nicht ganz übereinstimmen. Aus der Gattung Aspergillus ist technisch nur von Bedeutung der *Aspergillus Oryzae*, während von den Mucorineen *Mucor Rouxianus* (Amylomyces α), *Rhizopus japonicus* (Amylomyces β), *Rhizopus tonkinensis* (Amylomyces γ) und *Rhizopus Delemar* in der technischen Literatur als ausgezeichnete Diastasebildner bekannt sind.

Der Gebrauch von Schimmelpilzen bei Herstellung alkoholischer Getränke ist in Ostasien, speziell in China und Japan, schon seit uralten Zeiten (man spricht von 2000 Jahren) eingeführt. Als Rohmaterialien kommen dort auch heute noch alle stärkereichen Stoffe in Betracht, jedoch wird fast nur Reis in großem Maßstabe verarbeitet. Unter Zuhilfenahme von Schimmelpilzen und Hefen werden diese Rohstoffe verzuckert und vergoren.

Obgleich jener Industriezweig in C h i n a schon so lange bekannt ist, kam er hier doch nicht erheblich über seine primitiven Anfänge hinaus, denn die bei der chinesischen Arbeitsweise resultierenden Produkte sind in vielen Fällen ganz minderwertig oder gar unbrauchbar. Es sind weniger die technischen Hilfsmittel, deren sich der Chinese bedient, als viel mehr die Art und Weise der Gewinnung und der Heranzüchtung des Pilzmaterials, durch welche die Arbeitsweise so unvollkommen erscheint. Die Chinesen, kaum vertraut mit dem Wesen der Mikroorganismen, gründen die Herstellung ihrer alkoholischen Getränke lediglich auf die alte praktische Erfahrung, daß verschimmeltes Reismehl unter bestimmten Bedingungen in Gärung übergeht. Die Pilze, deren sie sich bedienen, sind eine Anzahl wild eingefangener Mucorineen. Es wird kein Wert darauf gelegt, unter diesen Organismen irgend eine zielbewußte Auswahl zu treffen. Zur Erzeugung einer reichlichen Pilzvegetation wird einfach angefeuchtetes Reismehl unter Bedingungen gebracht, die eine rasche Entwicklung der in und auf demselben enthaltenen, zum Teil auch aus der Luft stammenden Keime zur Folge haben. Neben den wertvollen Organismen, gewissen Schimmelpilzen und Alkoholhefen, stellt sich eine Menge schäd-

licher ein (es sind dies vor allem Bakterien), welche jene stark beeinträchtigen; das ist der große Nachteil dieser primitiven Arbeitsweise. Das von solchen Mikroorganismen reichlich durchsetzte Reismehl wird in Form talergroßer, pfeffernußähnlicher, weißgrauer Kuchen getrocknet als „Chinesische Hefe“ in den Handel gebracht. Die Vielfältigkeit und der Reichtum, den die Organismenwelt jener Reismehlkuchen aufweist, ist daraus zu ersehen, daß in „Chinesischer Hefe“ 30 Bakterienarten, 28 verschiedene Hefen, 8 Mucorarten und zwei andere Schimmelformen aufgefunden worden sind. Diese „Chinesische Hefe“ nun, von den Malayen als „Ragi“ bezeichnet, bildet in einem großen Teile Ostasiens die Grundlage bei Bereitung von berauschenden Getränken. Zum Zwecke der Verzuckerung und Vergärung werden die gedämpften Rohmaterialien, fast ausschließlich Reis, einfach mit den zerkleinerten, verschimmelten Reismehlkuchen bestreut und mit Wasser angerührt. Auf diese Weise bereitet man in Ostasien den chinesischen Reiswein, das Hauptgetränk der Chinesen, aus dem durch Destillation der Reisbranntwein gewonnen wird, und den javanischen Arrak.

Haben wir es bei den Chinesen meist mit sehr primitiven Verfahren zu tun, in denen ausschließlich Mucorineen die Verzuckerung besorgen, so sehen wir in den japanischen Verfahren nur Vertreter aus der Gattung *Aspergillus* als amylolytisch wirkende Pilze auftreten, die durch eine Art „Reinkultur im Großen“ (natürliche Reinzucht) für die Praxis herangezüchtet werden. Es hat hier also ein Pilz, der den gestellten Bedingungen am besten genügte, den Vorzug erhalten, während man die übrigen Organismen so gut wie möglich zu unterdrücken suchte. Der Verzuckerungspilz wird auf gedämpftem Reis herangezüchtet und wenn letzterer von Pilzmasse gründlich durchsetzt ist, kommt das Ganze als „Koji“, d. i. Pilzmalz, getrocknet in den Handel. Beim Gebrauche wird das zerkleinerte Koji größeren Mengen von gedämpftem Reis zugesetzt, wodurch auf diesem eine reichliche Pilzvegetation erzeugt wird, welche die Verzuckerung der Reisstärke besorgt. Die Alkoholhefen werden

von den Japanern nicht, wie in China, neben den Schimmelpilzen kultiviert, sondern man bereitet dort eigens eine Art Hefengut, den sogenannten „Moto".

„Koji" und „Moto" der Japaner entsprechen der „Chinesischen Hefe", stellen aber, wie gesagt, ein bedeutend besseres Zuchtverfahren dar, als es bei Herstellung von „Chinesischer Hefe" in Gebrauch ist. Dementsprechend steht auch die japanische Alkoholindustrie, wenigstens in Hinsicht auf die Sakébrauerei, in welcher als Verzuckerungspilz der *Aspergillus Oryzae* verwendet wird, auf einer sehr beachtenswerten Stufe. Neben dem Saké, dem Nationalgetränk der Japaner, bereitet man dort auch noch andere alkoholischen Getränke, den Awamori, den Batatenbranntwein u. a., alle unter Zuhilfenahme von Koji, der mit *Aspergillaceen* durchsetzt ist.

Nachdem die wissenschaftliche Forschung in das Wesen der ostasiatischen Pilzverzuckerung näher eingedrungen war, erkannte man, daß die dortigen Arbeitsweisen, technisch weiter ausgebaut, sich auch auf das moderne Gärungsgewerbe übertragen lassen würden. An praktischen Versuchen dazu hat es denn auch nicht gefehlt; wie diese durchgeführt wurden und welchen Erfolg sie hatten, soll im nachfolgenden ausführlicher betrachtet werden.

Die Idee, daß sich die alten ostasiatischen Methoden der Pilzverzuckerung durch gesonderte Heranzüchtung des wirksamen Organismus sowie durch steriles Arbeiten verbessern ließen, wurde zuerst (im Jahre 1889) von dem Japaner Takamine praktisch verwertet. Das nach ihm benannte *Takamineverfahren* (zusammen mit dem sogenannten Amyloverfahren als Pilzmaischverfahren bezeichnet), welches mittlerweile wieder eingegangen ist, benützte zur Verzuckerung der stärkehaltigen Rohmaterialien einen Auszug von auf Weizenkleie herangezüchtetem *Aspergillus Oryzae*. Der Gedanke, den Pilz hierbei in groß angelegten Reinkulturen auf einem billigen Material heranzuzüchten, war jedenfalls sehr beachtenswert. Takamine, der sein modernisiertes Verfahren patentieren ließ, wollte hierbei dem *Aspergillus* neben

der Verzuckerung auch die Durchführung der alkoholischen Gärung übertragen vermöge einer, wie er glaubte, von diesem Pilze gebildeten Sproßform. *Aspergillus Oryzae* ist jedoch kein Erreger alkoholischer Gärung. In der Praxis wurde schon von Anfang mit einer japanischen Hefe gearbeitet. Die praktische Durchführung des Takamineverfahrens übernahm eine nordamerikanische Gesellschaft, welche zu diesem Zwecke in Peoria (Illinois) eine große Brennereianlage erbaute. Eine knappe Schilderung der dortigen Arbeitsweise verdanken wir Delbrück[2]) und Saare[17]), welche die Brennerei selbst besichtigten.

Die mit den Pilzsporen vermengte *sterile* Kleie hielt man zur Erzeugung einer reichlichen Pilzvegetation zunächst einige Tage bei 40° C. Die Masse wurde dann in großen Diffusionsapparaten extrahiert und der Auszug unmittelbar darauf mit dem inzwischen gedämpften Mais gemaischt. Die Verzuckerung sollte hierbei angeblich schon in 15 Minuten beendet sein. Der Gärprozeß, der durch eine nicht näher bekannte japanische Hefe eingeleitet wurde, dauerte bei einer Temperatur von ca. 21—32° C 3—4 Tage. Aus 100 kg Mais sollen auf diese Weise 37,2%—40% Alkohol gewonnen worden sein, was einer sehr guten Ausbeute entsprechen würde. Trotzdem wurde der Betrieb schon nach einigen Jahren wieder eingestellt. Allem Anscheine nach machten sich bei dem Verfahren empfindliche Mängel geltend (ungenügende Sterilität etc.), die zur Einstellung des Betriebes führten.

Dagegen ist die *Takadiastase* noch heute in Form eines gelblichweißen, feinen, hygroskopischen Pulvers im Handel. Sie wurde zuerst 1898 von Takamine hergestellt, indem er den wässrigen Extrakt der von dem Reisschimmel durchsetzten Weizenkleie mit Alkohol fällte, den Niederschlag trocknete und pulverisierte.

Während die *Aspergillus*-Verzuckerung also eine wirkliche Bedeutung für die moderne Brennerei nie erlangt hat, liegt die Sache wesentlich anders bei den aus der „Chinesischen Hefe“ isolierten *Mucorineen*. Diese haben durch die unablässigen

Arbeiten französischer Forscher die Basis für ein neues Brennereiverfahren gegeben, das sich im Laufe der letzten 15 Jahre zu großer technischer Bedeutung und Verwendung entwickelt hat. Es ist dies das sogenannte *Amyloverfahren*, welches in dem folgenden Abschnitt ausführlicher behandelt werden soll.

Das Amyloverfahren.

Wie Takamine den *Aspergillus Oryzae* aus japanischem Koji für praktische Zwecke isolierte, so versuchte der französische Forscher Calmette aus „Chinesischer Hefe" mit ihrem mannigfaltigen Pilzgemenge bestimmte *Mucorineen* reinzuzüchten und die Reinzuchten in das Gärungsgewerbe einzuführen. So isolierte er zuerst im Jahre 1892 aus „Chinesischer Hefe" von Saigon einen *Mucor*, dem er wegen dessen damals zweifelhafter systematischen Stellung die Bezeichnung *Amylomyces* (Stärkepilz) *Rouxii* beilegte. In der technischen Literatur kennt man diesen Pilz unter dem Namen *Amylomyces α*; erst später wurde er von Wehmer[20]) als echter *Mucor* erkannt und von ihm mit der Bezeichnung *Mucor Rouxianus* belegt. Der von Calmette aufgestellte Gattungsname gab dem als „Amyloverfahren" bezeichneten neuen Zweig der Brennerei seinen Namen. Hatte Calmette schon im Jahre 1891 für die französischen Besitzungen in Hinterindien die Verwendung reingezüchteter Pilze an Stelle der von Bakterien durchsetzten „Chinesischen Hefe" empfohlen, so ging er jetzt noch einen Schritt weiter, indem er die Anregung zur Verwendung dieses Pilzes im europäischen Brennereigewerbe gab. Im Jahre 1897 entstand die erste „Amylobrennerei" in Seclin bei Lille (Frankreich), in der nach einem patentierten Verfahren von Collette und Boidin der Amylomyces *α* zuerst praktisch erprobt wurde. Er bewährte sich dort infolge seiner ausgezeichneten diastatischen Kraft ganz vorzüglich und wurde vorläufig an Stelle des Malzes weiter benutzt. Später wurde dieser *Mucor* durch die ihm nahe verwandten *Rhizopus*-Arten ersetzt. Zunächst tauchte in der

technischen Literatur der von Boidin aus japanischem Koji von Tonkin im Jahre 1900 isolierte Amylomyces β auf, der von Vuillemin[19]) 1902 als *Rhizopus japonicus* bezeichnet wurde. Boidin führte diesen *Rhizopus* hierauf an Stelle des *Mucor Rouxianus* in Seclin ein, wo er sich infolge seiner größeren Wachstumsschnelligkeit und Widerstandsfähigkeit sowie seines dem *Mucor* gegenüber gesteigerten diastatischen Vermögens besser bewährte. Ein dem Techniker unter dem Namen *Amylomyces γ* bekannter Schimmelpilz, der *Rhizopus tonkinensis*, gleichfalls, nur etwas später wie *Rhizopus japonicus* aus japanischem Koji reingezüchtet, unterscheidet sich kaum von diesem und hat auch die gleiche praktische Bedeutung. Während mehrere Amylobrennereien heute noch mit den letztgenannten *Rhizopus*-Arten arbeiten, ist in den Anlagen zu Seclin schon seit einigen Jahren ein neuer *Rhizopus* eingeführt, der von Delemar, einem Chemiker Boidins, reingezüchtet und nach ihm anfangs *Mucor Delemar*, später aber richtiger *Rhizopus Delemar* genannt wurde. In allerneuster Zeit hat dieser Pilz auch in andere Amylobrennereien Eingang gefunden und überall sehr zufriedenstellende Resultate gezeitigt.

Natürlich wurde, neben der Heranzüchtung von brauchbarem Pilzmaterial, auch in der technichen Einrichtung und der Verbesserung des Verfahrens überhaupt möglichste Vollkommenheit angestrebt, sodaß heute nicht nur Mais, sondern auch Reis und Maniok, ferner Kartoffeln und Roggen (in Deutschland) in verschiedenen Brennereianlagen mit sehr gutem Erfolge verarbeitet werden können. Mais und Reis spielen naturgemäß auch heute noch die Hauptrolle unter den stärkereichen Rohmaterialien.

Wie aus dem Vorstehenden schon zum Teile ersichtlich ist, bestehen die Hauptunterschiede des Amyloverfahrens gegenüber den älteren Arbeitsmethoden einmal darin, daß an Stelle des Malzes Schimmelpilze treten und daß ferner während des ganzen Prozesses steril gearbeitet wird. Es sei jedoch erwähnt, daß anfangs das Amyloverfahren noch mit geringen Mengen Malz arbeiten mußte, nur um die Stärke zu verflüssigen, die

in unverflüssigtem Zustande nicht oder nur sehr schwer vom Pilz angegriffen wird. Heute kommt auch diese Malzquantität, bestimmte Rohmaterialien ausgenommen, in Wegfall.

Die technische Durchführung des Verfahrens gliedert sich in folgende Prozesse:

Die **Heranzüchtung der Kulturen** von Amylopilz und Hefe.

Die **Vorbereitung des Rohmaterials** (Schroten bei Mais und Reis, Waschen und Reiben bei Kartoffeln).

Das **Einteigen des Rohmaterials** (bei Kartoffeln Verflüssigen mit Malz), daran anschließend

das **Dämpfen und Ausblasen** in den Gärbottich.

Die **Verzuckerung und Vergärung** im Bottich und endlich, nach beendeter Vergärung,

die **Destillation der Maische,** welche in den gewöhnlich gebrauchten Apparaten erfolgt.

Dem mit der Technik des Brennereigewerbes Vertrauten fallen schon bei dieser allgemeinen Übersicht die charakteristischen Unterschiede gegenüber den ältern Brennereiverfahren ins Auge: der Wegfall der Mälzerei und der Verzuckerung in einem besonderen Vormaischbottich sowie das Fehlen einer eigentlichen Kunsthefebereitung.

Grünmalz ist, wenigstens bei Verarbeitung der Hauptrohstoffe Mais und Reis, vollkommen zu entbehren (bei Kartoffel- und Roggenverarbeitung wird ein allerdings geringer Prozentsatz Malz zur Verflüssigung der Stärke gebraucht) und an seine Stelle tritt im Gegensatz zum Takamineverfahren nicht ein verzuckernder Pilzextrakt, sondern der lebende Organismus selbst, der somit, da er in der Maische weitergedeiht, auch die nachwirkende Kraft der Malzdiastase zu ersetzen imstande ist. Da der Pilz nur verflüssigte Stärke angreift, mußte die Vorbereitung der letzteren für die Verzuckerung besonders energisch gestaltet und weitergetrieben werden, als bei mit Malz arbeitenden Verfahren. Verzuckerung und Vergärung verlaufen im selben Bottiche zum großen Teil nebeneinander.

Da Reinkulturen von Pilz und Hefe ausgesät werden, die Aussaatmengen klein sind und antiseptische Zusätze zur Unterdrückung schädlicher Mikroorganismen hier nicht gemacht werden, so ergibt sich von selbst, daß deren Entwicklungsmöglichkeit durch steriles Arbeiten überhaupt ausgeschaltet werden muß. Das Amyloverfahren wird als ein typisches Reinzuchtverfahren durchgeführt. Es ist ein ideales Arbeitsverfahren insofern, als bei richtiger Einhaltung aller vorgeschriebenen Maßregeln und einwandfreier Apparatur eine Schädigung des Gärverlaufes durch wilde Hefen oder Bakterien überhaupt nicht eintreten kann und die ganze Gärung stets gleichmäßig rein unter geringer Säurebildung verläuft. Die Höhe der Alkoholausbeute wird somit durch Nebengärungen nicht beeinflußt, sondern in erster Linie nur bestimmt durch die Vollständigkeit der Aufschließung des Materials, die eines der am sorgfältigsten zu regulierenden Momente der Arbeitsweise ist, daneben natürlich durch zweckmäßige Regelung des Gärverlaufes selbst.

Sehr große Bedeutung hat das Amyloverfahren zweifellos für Länder, in denen wegen hoher Temperatur die Malzbereitung Schwierigkeiten verursacht, umsomehr, als gerade hier Materialien verarbeitet werden, bei denen (bei Mais und Reis) die Verwendung von Malz überhaupt ausgeschaltet ist. Dazu kommt noch, daß auch Verzuckerungs- und Gärtemperatur ziemlich hoch sind, also auch der etwaige Mangel an Kühlwasser von niederer Temperatur nicht ins Gewicht fällt.

Die exakte Ausgestaltung der ganzen Arbeitsweise, die namentlich in bakteriologischer Hinsicht mit peinlicher Genauigkeit zu handhaben ist, setzt gut geschultes Personal und eine zuverlässige Apparatur voraus. Die rationelle Ausnützung des nicht unbeträchtlichen Dampfverbrauches ist in größeren Betrieben besser gewährleistet. Die Hauptdomäne des Amyloverfahrens werden daher wie bisher, so jedenfalls auch in Zukunft, große gewerbliche Brennereien bleiben, namentlich solche in wärmeren Ländern, während kleinere landwirdschaftliche Betriebe schon wegen der Apparatur- und Lizenzkosten sich nur

in vereinzelten Fällen zur Einführung dieses Verfahrens zu entschließen scheinen.

Auf die erste Amylobrennerei in Seclin bei Lille folgten weitere in Frankreich, Belgien, Ungarn und anderen Ländern, sodaß das Verfahren im Brennereibetriebe jetzt eine bemerkenswerte Stellung einnimmt, namentlich angesichts der Größe einiger danach arbeitenden Brennereien. In Deutschland gibt es zur Zeit erst 5 Amylobrennereien, darunter 2 landwirtschaftliche, welch letztere neben Mais auch etwas Kartoffeln verarbeiten.

Obwohl sich die vorliegende Arbeit hauptsächlich mit dem Studium der bei dem Amyloverfahren gebrauchten Mikroorganismen beschäftigt, ist ein genauerer Überblick über die technische Gestaltung der Arbeitsweise hier von Interesse und es ist im folgenden kurz ausgeführt, wie sich die Verarbeitung der für deutsche Verhältnisse in Betracht kommenden Materialien (Mais, Kartoffeln und Roggen) gestaltet.

Die Verarbeitung von Mais.

Die Apparatur besteht aus Schrotmühle, Trempeur oder Einteigegefäß, erstem Dämpfer, zweitem Dämpfer (Détendeur), Gärbottich und Destillierapparat.

Das Einteigegefäß ist ein gewöhnliches, rundes, eisernes Bassin mit einfachem Rührwerk; der erste Dämpfer hat meist die gewöhnliche Henzeform (in Frankreich werden neuerdings wieder häufig liegende Dämpfer mit Rührwerk verwendet); der zweite Dämpfer hat eine schwächere Wandung und eine weniger stark konische Spitze wie der erste. Die Gärbottiche werden meist sehr groß ausgeführt (in einzelnen Betrieben bis zu 1200 hl), sodaß zu ihrer Befüllung mehrere Maischungen nötig sind. Sie sind aus Eisen konstruiert, geschlossen und mit mehrflügeligem, langsam laufendem Rührwerk versehen. Mittels einer Luftpumpe kann ihnen durch ein sterilisiertes Wattefilter Luft zugeführt werden. Der Austritt der Luft und

der Gärungsgase erfolgt unter Wasser in einem Waschgefäß oder Barboteur, in dem der mitgerissene Alkohol zurückgehalten wird.

Der Mais wird zunächst grob geschroten, dann im Einteigegefäß mit warmem Wasser unter Zusatz von Salzsäure (ca. 7 l von 18° Bé auf 1000 kg Mais) ca. $1^1/_2$ Stunden bei 55—60° C gerührt. Die Salzsäuremenge ist so gering bemessen, daß sie durch Phosphate und organische Salze des Mais vollkommen aufgenommen wird. Die Maische wird dann in den ersten Dämpfer überführt und je nach Beschaffenheit des Mais hier $^1/_2$ Stunde oder länger bei 4 Atmosphären gedämpft. Darauf wird in den Détendeur mit möglichst starkem Druckabfall so ausgeblasen, daß nach Beendigung dieser Operation der Druck im zweiten Dämpfer ca. 2 Atmosphären beträgt. Dieser Druck wird im Détendeur ungefähr $^1/_4$ Stunde aufrecht erhalten, worauf man in den Gärbottich ausbläst.

Durch dieses kombinierte, von Boidin eingeführte Dämpfverfahren wird unter Mitwirkung der Säure eine gute Verflüssigung der Stärke erzielt. Die durch das erste Ausblasen explosionsartig zerrissenen Maisteilchen werden beim zweiten Dämpfen nahezu vollkommen aufgeschlossen und verflüssigt. Im Gärbottich resultiert eine nach Abfiltrieren von den Trebern in heißem Zustande ganz klare Maische, die nach Abkühlen allmählich unter Ausscheidung gelöster Stärke sehr dickbreiig wird. Die Jodreaktion ist nicht mehr rein blau, sondern schon etwas violett, sodaß bereits ein weiter gehender Abbau der Stärke eingeleitet ist. Die Konzentration entspricht bei Mais etwa 14—15° Balling. Höhere Konzentrationen können anscheinend ohne Reduktion der Ausbeute nicht erreicht werden.

Während des Ausblasens werden alle Öffnungen des Bottichs gründlich durch ausströmenden Dampf sterilisiert und dann verschlossen, ausgenommen das Abzugsrohr nach dem Barboteur hin. Gegen Ende des Ausblaseprozesses erfolgt unter besonderen Vorsichtsmaßregeln (Ausdämpfen und Flambieren der Anschlußstutzen etc.) das Anschließen des nach jeder Gärung

neu zu sterilisierenden Luftfilters an den Bottich, worauf bei Gang des Rührwerkes und Einblasen von steriler Luft durch Außenberieselung bis auf 40° C herabgekühlt wird.

Bei dieser Temperatur erfolgt die Einimpfung einer mit sterilem Wasser aufgeschlämmten Reinkultur des auf Reis gezüchteten Amylopilzes durch einen im Deckel des Bottichs angebrachten, mit Hahn und Gummischlauch versehenen Impfstutzen und zwar gelangen auch für große Bottiche nur wenige Gramm zur Aussaat, die allerdings Millionen von Sporen enthalten. Geschieht das Impfen der Bottiche mit dem Pilz vorschriftsmäßig, so ist bei dieser wichtigen Operation eine Infektionsgefahr ausgeschlossen, umsomehr, als im Inneren des Bottichs infolge der Luftzuführung stets ein geringer Überdruck vorhanden ist.

Unter Wirkung des Rührens und ständigen Lüftens verteilen und entwickeln sich die Pilzsporen rasch und schon nach 18—24 Stunden ist die ganze Maische von mikroskopisch sichtbaren Pilzmyzelflocken erfüllt. Es ist von Wichtigkeit, daß durch die Bewegung der Maische der Pilz ständig untergetaucht und verteilt wird, da bei Oberflächenwachstum eine nicht erwünschte Sporenbildung eintreten würde. Nach 30—36 Stunden ist durch Einwirkung der vom Pilz sezernierten Enzyme so viel Zucker (ca. 3%) gebildet, daß die Aussaat der speziell für das Amyloverfahren gezüchteten Hefe (*Levure anamite*) erfolgen kann, die in derselben Weise wie die Pilzaussaat (und auch in ganz geringen Mengen) vorgenommen wird.

Hefe und Pilz arbeiten nun nebeneinander. Während der Hefevermehrung steigt der Zuckergehalt der Maische stark und der Pilz vermehrt sich beträchtlich. Von der Leistungsfähigkeit des Pilzes zeugt die Tatsache, daß er in großen Amyloapparaten von 1200 hl Inhalt stündlich rund 500—600 kg Zucker zu bilden vermag. Ungefähr 20 Stunden nach der Hefeeinsaat hat sich die Hefe so stark vermehrt, daß bereits eine lebhafte Gärung und Kohlensäureentwicklung zu beobachten ist. Jetzt fallen Saccharometeranzeige und Zuckergehalt anfangs rasch,

dann langsamer und nach 100—110 Stunden von der Pilzeinsaat an gerechnet ist die Gärung beendet. Das Rührwerk bleibt bis gegen Ende des Gärprozesses im Gange, die Luftzufuhr wird mit beginnender Gärung gemildert und schließlich ganz abgestellt, sobald die Kohlensäureentwicklung stark genug geworden ist.

Die durch den Amylopilz gebildete Zuckerart ist nach Boidin Dextrose neben etwas Maltose, sodaß der *Rhizopus* jedenfalls auch Amylo-Maltase oder ähnliche Enzyme erzeugt. Ob und bis zu welchem Grade seine Diastase mit der des Malzes identisch ist, bleibt zweifelhaft, besonders angesichts der Tatsache, daß der Pilz nur verflüssigte Särke verarbeitet, ihm also eine die Stärke verflüssigende Wirkung abgeht, während die Malzdiastase bekanntlich auch nicht verflüssigte Stärkekörner sehr energisch angreift und überhaupt bedeutend schneller wirkt als die Pilzenzyme.

Interessant ist das Alkoholbildungsvermögen des Pilzes. Schon vor Aussaat der Hefe ist in der Maische Alkohol vorhanden, erzeugt durch das Gärvermögen des *Rhizopus*, das aber zur technischen Verarbeitung des Zuckers ohne die Unterstützung der Hefe bei weitem nicht ausreicht. Mit dem Einsetzen der Hefegärung hört das Wachstum des Pilzes allmählich auf, während die gebildeten verzuckernden Enzyme weiterwirken. Der Protoplasmainhalt der Pilzfäden, der anfangs schaumig erscheint, wird mit der Zeit stark granuliert.

Die Vergärung der reifen Maische geht bei Mais auf etwa —0,2 bis —0,4° Balling herunter bei einem Alkoholgehalte von ca. 7 Vol. %. Die Ausbeute von 100 kg eingemaischter Stärke beträgt nach Boidin bis 66 Liter absoluten Alkohols. Zweifellos ist die gute Ausbeute in erster Linie auf Rechnung der Vermeidung jeglichen Alkoholverlustes durch geschlossene Bottiche und das Waschgefäß für die Gärungsgase zu setzen.

Die Verarbeitung von Kartoffeln.

Diese gestaltet sich nicht so einfach wie die Maisverarbeitung, da die Kartoffelstärke sich nicht mit geringen Mengen Säure verflüssigen läßt und zur Verarbeitung des Materials hier eine gründliche Zerkleinerung und die Wirkung von Malz zuhilfe genommen werden muß. Nach einem patentierten Verfahren von Boidin werden die Kartoffeln zunächst mittels einer Kartoffelreibe fein zerrieben. Der Brei wird nach Verdünnen mit Wasser im Einteigegefäß soweit aufgewärmt, als es ohne Verkleisterung zulässig ist, mit $^1/_2$—$1\,^0/_0$ des (Kartoffelgewichtes) gut gequetschten und mit Wasser eingeteigten Grünmalzes versetzt, worauf die Temperatur rasch auf ca. 73° C gebracht wird, um eine verzuckernde Wirkung des Malzes möglichst zu unterbinden. Nach $^1/_4$ stündigem Rühren bei 73—75° C ist die Masse gut flüssig, kommt dann in den Dämpfer und wird ähnlich wie Mais, nur erheblich kürzer gedämpft.

Die Aufschließung und Verflüssigung der Kartoffeln ist bei dieser Arbeitsweise eine sehr gute. Die Pilzentwicklung stößt auf keinerlei Schwierigkeiten, sie verläuft nur etwas träger wie bei Mais. Hervorzuheben ist aber, daß nach Angaben der Kgl. Versuchs- und Lehrbrennerei Weihenstephan, an der das Amyloverfahren in einer Versuchsapparatur eingehend geprüft wurde, gerade bei Kartoffeln eine recht günstige Ausbeute vom Kilogramm Stärke erreichbar ist. Allerdings sind die zweckmäßigen Maischekonzentrationen noch niedriger als bei Maisverarbeitung. Die Jodreaktion der Schlempe ist in der Regel nur sehr schwach.

Arbeitsweise in Kornbrennereien.

Auch bei der Verarbeitung von Roggen in Kornbrennereien wird der geschrotene Roggen mit etwas Malz verflüssigt, bei 1—2 Atmosphären kurz gedämpft und im Détendeur nur aufgekocht. Die Pilzentwicklung verläuft hier nach Angabe der

Amylogesellschaft schnell, sodaß die Hefe schon nach 14 Stunden zugesetzt werden kann und die Gärung nach 72 Stunden von der Pilzaussaat an beendet ist.

Die Herstellung der Kulturen von Pilz und Hefe.

Die Herstellung der Aussaatkulturen von Amylopilz und Hefe ist natürlich eine der wichtigsten Operationen des ganzen Amylobetriebes.

Der Pilz wird in kleinen, nur ca. 250 ccm fassenden Kölbchen auf einigen Grammen Reis gezüchtet, der vorher durch Dämpfen mit ganz wenig Wasser bei 1 Atmosphäre sterilisiert wurde. Die Impfung der Kölbchen geschieht mit einer geringen Menge einer fertigen, sporenreichen Kultur, die mit sterilem Wasser aufgeschlämmt ist. Bei einer Temperatur von 30—35° C entwickelt sich in den geimpften Kölbchen bald reichliches Pilzmyzel, das sich nach einigen Tagen unter Bildung von Sporangien dunkel färbt. Mit einem Alter von ca. 5 Tagen können die Kulturen meist schon verwendet werden und brauchen für den Zusatz zur Maische nur mehr mit sterilem Wasser aufgeschwemmt zu werden.

Die Herstellung der Hefekulturen gestaltet sich noch einfacher. Die Heranzüchtung erfolgt ebenfalls in Kölbchen von 250 ccm Inhalt in verzuckerter, klarer Maismaische von ca. 20° Balling. Auch Amylomaische selbst, im Stadium des höchsten Zuckergehaltes dem Gärbottich entnommen, eignet sich gut zu ihrer Entwicklung. Die Maische wird zunächst zur Ausfällung der Eiweißstoffe in größeren Gefäßen unter Druck gedämpft, dann nach dem Filtrieren oder Absetzen auf die Kölbchen verteilt und nochmals sterilisiert. Nach Übertragung einiger Tropfen einer Hefenkultur von einer früheren Operation tritt bei 30—35° C bald eine Gärung und kräftiger Hefeabsatz ein; nach 2—3 Tagen können die Kulturen in Gebrauch genommen werden.

Die Haltbarkeit der Pilzkulturen beträgt etwa 6 Monate. Die Hefekulturen sollen für Verwendung im Betrieb nicht älter als höchstens 4 Wochen sein.

Dieser einfache Ersatz der komplizierten Mälzerei und Kunsthefebereitung ist das Bestechendste bei dem Amyloverfahren. In einigermaßen geübten Händen erfolgt die sterile Herstellung der Impfkulturen mit vollkommener Sicherheit.

Da über Morphologie und Physiologie der interessanten Organismen des Amyloverfahrens noch nichts bezw. nur verhältnismäßig wenig veröffentlicht worden war, beschäftigte ich mich eingehender mit jenen, besonders mit der Hefe.

Die beim Amyloverfahren verwendeten Organismen.

Rhizopus Delemar.

Wehmer[21]) hat schon im Jahre 1910 darauf hingewiesen, das der *Rhizopus Delemar* sehr schwer von anderen *Rhizopus*-Spezies zu unterscheiden sei und dass vergleichende Untersuchungen mit anderen Rhizopus-Arten bereits im Gange wären. Da eine Veröffentlichung hierüber noch nicht erschienen war, begann ich, um mich zu orientieren, im Januar 1911 mit morphologischen Studien über jenen Pilz. Diese waren nahezu abgeschlossen, als Hanzawa[5]) eine ausführlichere Beschreibung des von ihm im Laboratorium des Herrn Prof. Wehmer untersuchten Pilzes publizierte. Infolgedessen wurden meine Untersuchungen abgebrochen. Da die von mir bis dahin erhaltenen Ergebnisse mit denen Hanzawas übereinstimmen, sehe ich von einer Mitteilung meiner eigenen Untersuchungen ab und führe nur die von Hanzawa aufgestellte Diagnose an, wobei ich auf die Abbildungen auf Tafel I verweise, welche nach meinen eigenen Beobachtungen gezeichnet sind.

Diagnose: Rhizopus Delemar (Boid.) Wehm. et Hanz. Rasen anfangs locker, weiss, später dicht, grau bis schwarz. Ausläufer weiss oder gefärbt, einfach oder verzweigt, mit oder ohne Rhizoiden, bis 20 μ im Durchmesser, bis 1—2 cm lang. Rhizoiden stark verästelt, anfangs farblos, später braun, oftmals mit Querwänden. Sporangienträger gerade oder gebogen, schwarzbraun gefärbt, bis 1—2 mm hoch, Stiel 22—26 μ breit, gewöhnlich unverzweigt, manchmal aber stark verästelt und dann grösser und oft mit blasigen Anschwellungen. Die kürzeren einfachen Träger wachsen aus beliebigen Punkten der Ausläufer hervor, gewöhnlich unweit der Rhizoiden. Sporangien kugelig bis abgeplattet kugelig, meist 140—180 μ im Durchmesser (zwischen 90—270 μ schwankend), anfangs weiss, später schwarz, oft mit einer deutlich stacheligen Sporangienwand. Columella kugelig oder abgeplattet (auch zugespitzt), 60—100 μ × 40—80 μ (Grenzen 44 × 30- 144 μ im Durchmesser), anfangs farblos, später hellbraun oder braun, glattwandig. Sporen hellgrau oder bräunlich, gestreift, in Gestalt sehr wechselnd, kugelig, oval, zylindrisch oder rundlich eckig, 8—13 μ × 6—9 μ (auch 4,5—20 μ lang). Gemmen (Chlamydosporen) farblos oder gelblich, verhältnismässig dünnwandig, hell und stark lichtbrechend, von verschiedener Grösse, 22—60 μ × 17—30 μ, unregelmässig, in jeder Form, von zylindrisch bis ganz kugelig. Kugelzellen kommen bei submersem Wachstum vor, Sprossung derselben habe ich nicht beobachtet. Zygosporen fehlen bislang.

Wächst gut auf verschiedenen Substraten, am besten auf Kartoffeln und Würze, verzuckert Stärke stark, vergärt Rohrzucker, Glykose, Mannose, Inulin, Galaktose, Fruktose, Maltose, Raffinose. Bildete innerhalb 14 Tagen in ungehopfter Würze 2,73 Gew.-Proz. Alkohol. Optimaltemperatur 25—30° C (Minimum 12° C, Maximum 42° C). Gelatine wird langsam verflüssigt. Bildet aus Zuckerarten freie Säure.

Levure anamite.

A. Allgemeines.

Die Hefe *Levure anamite* wird erst seit allerneuester Zeit beim Amyloverfahren verwendet. Man hat sie aus einem Gemenge wilder Hefen, wie sie auf dem Zuckerrohr und damit auch in den Zuckerrohrmaischen Cochinchinas auftreten, reingezüchtet. Bei ihrer Verwendung in der Praxis hatte man vor allem die hohe Gärtemperatur dieser Hefe im Auge, wodurch ein Zusammenarbeiten mit dem gleichfalls bei hoher Temperatur eingesäten Pilze leichter ermöglicht werden sollte.

Die Grundlage für die sämtlichen vorliegenden Untersuchungen bildete eine mir mit gütiger Erlaubnis der Sprit-Automatenbau-Gesellschaft zu Köln a. Rh. von der Kgl. Lehr- und Versuchsbrennerei Weihenstephan in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellte Kultur von *Levure anamite* auf schräg erstarrtem Würzeagar, wie sie zur Beimpfung der Gärbottiche verwendet wird. Zunächst wurden aus diesem Material Reinkulturen hergestellt, welche die Bezeichnung Nr. 1, 2 bis 6 incl. erhielten. Eine orientierende Untersuchung dieser sechs Reinkulturen sollte Aufschluß darüber geben, ob sie übereinstimmten oder ob sie zu verschiedenen Arten gehörten. Zu diesem Zwecke wurden von jeder derselben je 4 Riesenkolonien auf 10%iger gehopfter Bierwürzegelatine angelegt. Zeigten die Riesenkolonien prinzipielle Verschiedenheiten, so hätte mit Sicherheit der Schluß gezogen werden dürfen, daß in dem in der Praxis verwendeten Hefenmaterial ein Gemenge verschiedener Arten vorliegt. Für die weitere Bearbeitung hätten dann die zusammengehörigen Reinkulturen getrennt bearbeitet werden müssen. Es traten jedoch unter den Riesenkolonien keine prinzipiellen, sondern nur geringe individuelle Unterschiede auf. Diese Uebereinstimmung schloß aber Verschiedenheiten unter den Reinkulturen in anderer Hinsicht nicht aus. Das in der Praxis verwendete Hefenmaterial könnte trotzdem aus verschiedenen Arten bestehen. Die eingehende Untersuchung sämtlicher Reinkulturen würde eine

Aufgabe gewesen sein, welche Monate in Anspruch genommen hätte; deshalb wurden zwei ausgewählt und zwar Nr. 1 und 3, deren Riesenkolonien die beste Uebereinstimmung zeigten. Als später durch eine große Anzahl von Versuchen die Identität beider Reinkulturen sicher festgestellt worden war, wurde nur mehr mit einer (Nr. 1) weiter gearbeitet. Um einen Vergleich mit den in Deutschland verbreiteten Brennereihefen zu haben, wurden gleichzeitig die beiden Rassen II und XII, welche uns von dem Institut für Gärungsgewerbe in Berlin in dankenswerter Weise überlassen worden waren, untersucht. Eine nähere Beschreibung dieser beiden Hefen ist schon von Henneberg[6]) gegeben worden.

B. Morphologie.

I. Sporenbildung.

Auf die Bedeutung der Sporenbildung für die Familie der *Saccharomycetes* und die Unterscheidung ihrer Arten hat besonders Emil Chr. Hansen[3]) schon im Jahre 1883 hingewiesen.

Unter Berücksichtigung der von H. Will[22]) angegebenen Bedingungen, unter denen die Hefezellen am raschesten und reichlichsten Sporen bilden, wurden infolgedessen die Reinzuchten der *Levure anamite* zunächst auf Sporenbildung geprüft, um zu entscheiden, ob *Levure anamite* überhaupt den *Saccharomyceten* zuzuzählen ist und welcher Gruppe von Hefen sie angehört. Zu diesem Zwecke wurden 2 Tage alte Kulturen in gehopfter Bierwürze von 11,5° B verwendet, welche bei 25° C herangezüchtet und vorher oftmals in der gleichen Nährflüssigkeit aufgefrischt worden waren. Nach dieser Zeit standen, wie Versuche ergeben hatten, die Zellen im besten Stadium ihrer Entwicklung und hatten das Höchstmaß an Glykogenvorrat erreicht. Die Ausführung der Sporenkulturen erfolgte nach dem allgemein üblichen Verfahren auf Gipsblöcken. Jene wurden bei 25° C aufgestellt und dort 24 Stunden belassen. Nach

dieser Zeit konnte das Vorhandensein bereits reifer Sporen festgestellt werden.

Die Sporen von *Levure anamite* (Taf. II, Fig. 1) besitzen alle Charaktere der Sporen von wilder Hefe und gleichen den Sporen der beiden Brennereihefen Rasse II und Rasse XII. Die Sporenmembran ist glatt (bei 1030-facher Vergrößerung mittels Immersion beobachtet) und einfach. Die Sporen der *Levure anamite* stimmen hinsichtlich Form und Größe im allgemeinen mit denjenigen der meisten wilden Hefen überein. Die Form der Sporen ist im allgemeinen kugelig. Nur aufgequollene Sporen, die sich innerhalb der Mutterzellmembran gegenseitig drücken, sind wie gewöhnlich an den Berührungsstellen mehr oder weniger abgeplattet. Die Größe der Sporen bewegt sich innerhalb enger Grenzen und kann, wie auch bei anderen Hefen, in derselben Zelle verschieden sein. Ihre Zahl schwankt zwischen 1 und 4, am häufigsten ist die Zwei- und Dreizahl in einer Zelle vertreten. Aus nachstehenden Messungen ist die Größe der Sporen ersichtlich:

Sporenmutterzelle	Sporen
8,8 : 6,4 μ	4,0 μ
8,0 : 6,4 „	3,2 „
7,2 : 6,4 „	4,0 „ und 3,2 μ
8,0 : 6,4 „	4,0 „ „ 2,4 „
8,8 : 8,0 „	4,0 μ; 3,2 „ und 3,2 „
9,6 : 6,4 „	3,2 μ; 3,2 „ 3,2 „ „ 2,4 „

Gewöhnlich sind also die Sporen, wenn sie in größerer Zahl in einer Zelle ausgebildet werden, etwas kleiner als bei geringerer Anzahl. Doch sind auch einzeln vorkommende Sporen oft sehr klein. Hinsichtlich der Zahl der Sporen besteht Übereinstimmung mit Rasse II und Rasse XII; dagegen scheinen bei diesen beiden Hefen, wie aus Messungen hervorgeht, die Sporen etwas größer zu sein. Was die Zahl der sporenbildenden Zellen anbetrifft, so ist diese bei *Levure anamite* auch bei der für die Sporenbildung günstigsten Temperatur (25° C) gegenüber Rasse II und Rasse XII nicht besonders groß.

Sporenkeimung.

Um Sporen möglichst rasch und reichlich zum Auskeimen zu bringen, ist nach Hansen[1]) eine günstige Nährlösung, freier Zutritt von Luft und ziemlich hohe Temperatur notwendig. Am besten bewährt hat sich bis jetzt die Temperatur von 25° C. Von Nährflüssigkeiten kommen in erster Linie gut gelüftete, gehopfte oder ungehopfte Würze sowie steriler Traubenmost in Betracht. Mit *Levure anamite* wurde der Keimversuch in der Weise ausgeführt, daß man die Sporen in gehopfter Würze verteilte und damit Tröpfchenkulturen anlegte. Das Sporenmaterial war auf Gipsblöcken bei 25° C während 30 Stunden herangezüchtet worden. Erst nach Verlauf von 22 Stunden konnten die ersten keimenden Sporen beobachtet werden (Taf. II, Fig. 2). Die Keimung erfolgte nach dem von Hansen[23]) näher beschriebenen ersten Keimungstypus. Bei *Levure anamite* wurde nur eine Sprossung der Sporen durch die Mutterzellmembran hindurch beobachtet. Innerhalb der letzeren fand kein Auskeimen statt, auch konnte in keinem Falle ein Zerreißen der Mutterzellmembran bei der Keimung festgestellt werden. Damit soll aber nicht gesagt sein, daß die letztgenannten Fälle nicht auch bei *Levure anamite* eintreten können. Die ersten Sprosse haben bei *Levure anamite* häufig keimschlauchartiges Aussehen, doch treten in älteren, aus Sporen hervorgegangenen Zellkolonien fast nur mehr normale Formen auf. Eine Verschmelzung zweier Sporen fand nicht statt.

Bei Rasse II und Rasse XII keimten die Sporen bereits nach 4 Stunden aus. Die Keimung erfolgte gleichfalls nach dem ersten Typus. Hier war ein Platzen der Mutterzellmembran bei Beginn der Keimung öfter zu beobachten. Die zerrissene Zellwand lag dann in Form eines zarten geschrumpften Häutchens auf oder neben den Sporen. Bei Rasse II erfolgte das Auskeimen der Sporen in einigen Fällen innerhalb der Mutterzellmembran. Die Form der ersten wie auch aller später auftretenden Zellen war bei Rasse XII immer eine normale (rundlich),

während bei Rasse II die ersten Sprosse häufig keimschlauchartig waren und in den älteren Kolonien auch langgestreckte wurstförmige Zellen auftraten. Eine Verschmelzung zweier Sporen konnte auch bei diesen beiden Hefen nicht beobachtet werden.

Nährboden bezw. Nährflüssigkeit	Levure anamite	Rasse II.	Rasse XII.
Gehopfte Würzegelatine	—	—	Mäßig viel Sporen
Ungehopfte Würzegelatine	—	—	Ziemlich viel Sporen
Kartoffelwassergelatine	—	Sporen zahlreich	In den Kratern viel, sonst wenig Sporen
Hefenwassergelatine	—	Auffallend viel Sporen	Sporen zahlreich
Gelbrübenwassergelatine	Vereinzelt Sporen	—	Sporen selten
Weißkrautwassergelatine	—	—	Sporen selten
Weißrübenwassergelatine	—	—	Sporen selten
Kartoffelwasser	—	In der Haut auffallend viele, im Ring zahlreiche Sporen	Im Ring Sporen zahlreich
Gelbrübenwasser	—	Im Ring selten Sporen	—
Hefenwasser + Dextrose + Pepton Witte	—	—	Im Ring Sporen zahlreich
Mineralische Nährlösung (mit Asparagin) + Dextrose	—	Vereinzelt Sporen	—
Gehopfte Würze (Versuche über Gärungsform)	Vereinzelt Sporen	—	—
Hefenwasser + Laktose (Gärversuche). Hefenring	Wenig Sporen	Sporen zahlreich	Sporen zahlreich

Sporenbildung auf verschiedenen Nährböden und in Nährflüssigkeiten.

Erfahrungsgemäß können außer dem Gipsblocke noch Unterlagen, welche den notwendigen Bedingungen entsprechen, die Hefen zur Sporenbildung veranlassen. So werden z. B. Kartoffel- und Mohrrübenscheiben zur Sporenzüchtung verwendet. Auch Gelatine sowie Agar sind hierzu geeignet. In Flüssigkeitskulturen kommt ebenfalls Sporenbildung vor. Die Tabelle auf S. 30 gibt die festen und flüssigen Nährböden an, in welchen im Laufe der Untersuchungen (Riesenkolonien usw.) Sporenbildung beobachtet wurde. Neben *Levure anamite* wurden auch Rasse II und Rasse XII berücksichtigt. Da die Zahl der den Kulturen an verschiedenen Stellen entnommenen mikroskopischen Präparate naturgemäß eine verhältnismäßig geringe war, so können die in der vorstehenden Tabelle zusammengefaßten Untersuchungsergebnisse keine absolute Sicherheit bieten, immerhin darf wohl angenommen werden, daß das Sporenbildungsvermögen von *Levure anamite* weit weniger ausgeprägt ist als bei Rasse II und bei Rasse XII. Zu bemerken ist noch, daß die von *Levure anamite* gelegentlich der Versuche, welche entscheiden sollten, ob die Hefe obergärig oder untergärig ist, in gehopfter Würze bei Obergärungserscheinungen gebildeten Sporen im Gegensatz zu den stark lichtbrechenden Sporen typischer wilder Hefen schwach lichtbrechend waren und sehr an Kulturhefensporen erinnerten.

Sporenkurve.

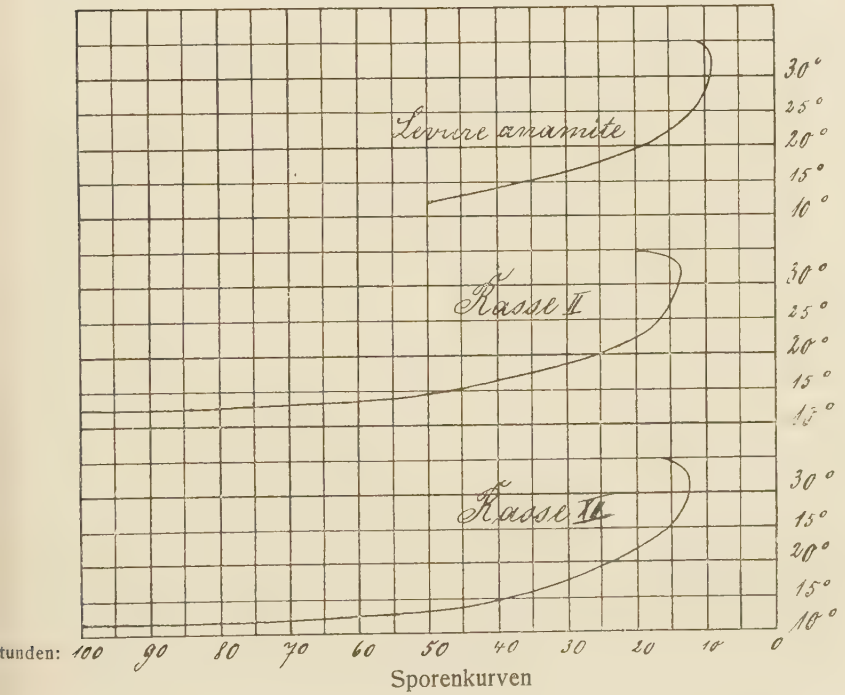
Nachdem festgestellt war, daß *Levure anamite* nach dem Charakter ihrer Sporen zur Gruppe der wilden Hefen gehört, mußte untersucht werden, wodurch sie sich von den übrigen, bisher näher studierten wilden Hefen unterscheidet. Von den diagnostischen Merkmalen mußte zuerst die „Sporenkurve“ in Betracht gezogen werden. Sie gibt Aufschluß über den Verlauf der Sporenbildung in ihrer Abhängigkeit von der Temperatur

und stellt nach allen bisherigen Erfahrungen eines der wichtigsten Unterscheidungsmerkmale dar.

Die Festlegung der Sporenkurve stützt sich auf die Beobachtung der Zeit, nach deren Verlauf bei bestimmten, verschiedenen Temperaturen unter den gleichen Bedingungen in den Zellen die ersten Anzeichen der Sporenbildung, die Sporenanlagen, sichtbar werden. Wesentlich für den Charakter der Sporenkurve sind die drei Hauptpunkte der Temperatur, das Maximum, Optimum und Minimum. Die Angaben der Zeit über das Auftreten der ersten Sporenanlagen werden in ein Koordinatensystem (die Zeitangaben auf der Abszisse, die Temperaturgrade auf der Ordinate) eingetragen und die Temperaturpunkte durch eine Linie miteinander verbunden. Man erhält auf diese Weise die „Sporenkurve", deren Verlauf für jede Hefe charakteristische Momente aufweist. Bei Festlegung der Sporenkurve für *Levure anamite* wurde wie folgt verfahren:

Zunächst wurde ermittelt, bei welchem Alter der Kulturen unter den eingehaltenen Bedingungen die Sporenbildung am frühesten und ausgiebigsten stattfindet. Zu diesem Zwecke war die Hefe in gehopfter Bierwürze von 11,5° B bei 25° C herangezüchtet worden. Nach verschiedenem Alter dieser Kulturen wurden mit der Bodensatzhefe auf vorschriftsmäßig vorbereiteten Gipsblöcken Sporenkulturen angelegt. Es zeigte sich hierbei ein Alter der Hefe von 50—55 Stunden als für die Sporenbildung am günstigsten. Daher wurde bei allen für die Sporenkurve in Betracht kommenden Kulturen nur 50 — 55 Stunden alte Hefe benützt. Zu jeder Temperatur, bei welcher Sporenbildung beobachtet werden sollte, wurden je 4 Gipsblockkulturen gestellt und zunächst durch systematisches Ausprobieren die für die betreffende Temperatur geltende früheste Zeit für das Auftreten der ersten Sporenanlagen ungefähr bestimmt. Erst dann erfolgte die genaue Fixierung des Zeitpunktes. (Beigefügt sind hier die Zeiten und Kurven von Rasse II und Rasse XII).

Temperatur ° C	$7^1/_2{}^0$	9^0	12^0	14^0	17^0	20^0	25^0	28^0	31^0	33^0	35^0	36^0
Levure anamite (Zeit in Stunden)	—	—	50	40	27	19	11	10	$9^1/_2$	9	12	—
Rasse II (Zeit in Stunden)	—	10 Tage	$4^1/_2$ Tage	54	35	26	16	$14^1/_2$	14	$13^1/_2$	20	—
Rasse XII (Zeit in Stunden)	—	8 Tage	3 Tage	46	33	24	15	14	$13^1/_2$	13	17	—



Sporenkurven

In der Schnelligkeit der Sporenbildung wird also *Levure anamite* von keiner bis jetzt untersuchten Hefe übertroffen. Bei der Optimaltemperatur bildete sie noch um 2 Stunden früher Sporen als H. Wills wilde Hefe No. 811, die zur Bildung der ersten Sporenanlagen 11 Stunden (bei 34°C) braucht. Damit ist *Levure anamite* also nicht nur hinsichtlich der Beschaffenheit ihrer Sporen, sondern auch hinsichtlich der Schnelligkeit, mit welcher jene beim Temperaturoptimum auftreten, als eine typische wilde Hefe charakterisiert. Mit Rasse II und Rasse XII, die gleichfalls sehr früh Sporen bilden, hat sie das Optimum (33°C) gemeinsam, dagegen liegt das Minimum höher als bei Rasse II und Rasse XII, die in allen Kardinalpunkten übereinstimmen, wobei jedoch die Zeit, nach welcher die ersten Sporenanlagen auftreten, verschieden ist. Daß bei *Levure anamite* das Minimum nicht so tief liegt als bei den andern beiden Hefen, hat vielleicht in der tropischen Abstammung der ersteren seinen Grund. Bei 12°C, der unteren Grenze der Sporenbildung von *Levure anamite*, treten bei Rasse II und besonders bei Rasse XII noch zahlreiche Sporen auf, während sie bei *Levure anamite* äußerst selten sind. Auch wurde die Beobachtung gemacht, daß an der Maximal- und Minimalgrenze die Sporen fast ausschließlich in der Einzahl in einer Zelle (es gilt dies für alle drei Hefen) auftreten.

II. Hautbildung.

Die Hautbildung, d. h. die Entwicklung einer Oberflächenvegetation auf Nährflüssigkeiten ist eine den Sproßpilzen allgemein zukommende Eigenschaft. Ebenso wie bei der Sporenbildung ist auch bei der Hautbildung die Temperatur ein ausschlaggebendes Moment und es können auch hier wieder in erster Linie die drei Hauptpunkte der Temperatur zur Unterscheidung verschiedener Hefenarten herangezogen werden. Ferner kommt für die Unterscheidung der Typus der Haut in Betracht, der hier allein berücksichtigt werden soll.

Die Versuchsanstellung unter Einhaltung der für die Hautbildung nach H. Will[21] günstigsten Bedingungen war folgende :

300 cm fassende Erlenmeyerkolben wurden bis zu 2,5 cm Höhe mit gehopfter Würze von 11,5 °B befüllt und vorschriftsmäßig sterilisiert. Nachdem die Kolben mit der Würze zwecks Lüftung noch einige Tage im Laboratorium gestanden hatten, wurde in jeden Kolben je eine Platinöse der Bodensatzhefe einer Kultur von *Levure anamite* eingeimpft. Diese Kulturen, welche zunächst nur zum Studium der morphologischen Verhältnisse der Haut dienten, blieben bei ca. 20 °C an einem ruhigen Platze stehen. Nach ungefähr 8 Tagen zeigten sich auf der Flüssigkeitsoberfläche die ersten Hefeninselchen, die anfangs wenig deutlich erschienen, sich aber rasch vermehrten und dabei in scharf umgrenzte, stark hervortretende weißliche Flecke von trockener Beschaffenheit umwandelten. Bei 52-facher Vergrößerung ließ die Oberfläche der scharf begrenzten Hautinselchen infolge radialer Anordnung der Zellen teils eine regelmäßige Struktur erkennen, teils erschien sie unregelmäßig (mehr oder weniger flockig). In einigen Fällen boten die Inselchen schon dem unbewaffneten Auge das Bild kleiner Riesenkolonien dar. Die Hefeinselchen, die anfangs einzeln und verteilt auf der Flüssigkeitsoberfläche lagen, schlossen sich früher oder später zu einer Haut zusammen, welche manchmal die ganze Flüssigkeitsoberfläche, manchmal nur einen Teil derselben bedeckte. Innerhalb der Haut erschienen die einzelnen Hefeinselchen häufig noch deutlich umgrenzt. Die junge Haut hält sich gut auf der Flüssigkeitsoberfläche. In älteren Kulturen wird sie mehr oder weniger schleimig, wächst merklich in die Dicke und sinkt in kleineren Partikeln leicht zu Boden, hat also nicht mehr den festen Zusammenhalt wie die junge Haut. Sie läßt ein sehr feines, glänzendes, die Flüssigkeitsoberfläche überziehendes Häutchen zurück. In diesem Stadium der Hautbildung ist auch ein mäßig stark entwickelter Hefenring vorhanden. Die Hautbildung folgt also dem Typus II a wie bei den meisten Saccharomyceten. Die Hautinselchen bestanden

hauptsächlich aus Zellen (Tafel II, Fig. 3), welche sich zuerst in der Nährflüssigkeit entwickelt und die Gärung hervorgerufen hatten neben kleinen ovalen Zellen, die in ihrer späteren Nachkommenschaft auch Wurstform annehmen können („erste Generation der echten Hautzellen"). Solche wurstförmigen Zellen sind in den Hautinselchen von *Levure anamite* in mäßiger Zahl vorhanden und nur ganz selten zu ausgedehnten Sproßverbänden vereinigt. Ihre Größe bewegt sich meist zwischen 9,0 : 4,5 μ. Länger als 12,8 : 4,0 μ sind sie nicht. Auch die übrigen Zellformen zeigen keine große Neigung zur Bildung von Sproßverbänden. Kronenbildung, eine in den Hautkulturen häufig auftretende Art der Sprossung, konnte bei *Levure anamite* nur in einzelnen Fällen beobachtet werden. In 2 Monate alten Kulturen mit geschlossenem Ring und schleimiger Haut traten viele Zellen auf, die das Aussehen von Dauerzellen hatten. Auch typische Dauerzellen kamen in geringer Zahl vor. Das feine, zarte Häutchen, das nach dem Sinken der dickeren Haut auf der Flüssigkeitsoberfläche zurückbleibt, besteht zum größten Teile aus derartigen dauerzellenähnlichen Zellen. Die langgestreckten wurstförmigen Zellen scheinen nicht mehr so zahlreich zu sein wie in jungen Hautkulturen. Drei Monate alte Kulturen enthielten noch mehr typische Dauerzellen. Sproßverbände langgestreckter Zellen („zweite Generation der echten Hautzellen"), wie sie in älteren Kulturen der meisten Saccharomyceten auftreten, konnten selbst in drei Monate alten Kulturen von *Levure anamite* nicht beobachtet werden.

Im Vergleich zu *Levure anamite* sind bei Rasse XII die Hefeinselchen weniger scharf umgrenzt und sind innerhalb der eben geschlossenen Haut nicht mehr als solche zu erkennen, sie verschmelzen also leichter. Bei 52-facher Vergrösserung zeigen sie sehr häufig eine scharf ausgeprägte, radiale Anordnung der Zellen, die manchmal bis zur Mitte der Hautinselchen deutlich zu verfolgen war. Rasse XII bildet eine mattglänzende Haut, die sehr leicht zu Boden sinkt, wobei sie sich in größere Flocken zerteilt. Die Haut ist, besonders in älteren Kulturen,

dicker als bei *Levure anamite*. Auch der Ring zeigt bei dieser Hefe eine kräftigere Entwicklung. Die Hautinselchen von Rasse XII sind vor allem ausgezeichnet durch das Auftreten sehr zahlreicher, myzelartig sich ausbreitender Sproßverbände ovaler bis langgestreckter, wurstförmiger Zellen, die sehr fest zusammenhängen. Ihre Größe bewegt sich meist um 11,9 : 4,4 μ, doch kommen auch Zellen bis zu 19,2 : 3,2 μ Größe vor, sind also merklich länger als bei *Levure anamite*. In drei Monate alten Hautkulturen traten neben Dauerzellen, besonders in der Haut (weniger im Ring), wurstförmige, manchmal auch keulen- bis bisquittförmige Zellen auf, die zu ausgedehnten Sproßverbänden vereinigt waren. Sie sahen den Zellen der „ersten Hautgeneration" sehr ähnlich, waren jedoch im allgemeinen dicker (meist zwischen 10 : 4 μ und 8 : 3,5 μ groß) und stärker granuliert als diese und besaßen auch eine stärkere Wandung. Sie reagierten meist deutlich, manchmal sogar recht kräftig auf Glykogen.

Die Hautinselchen von Rasse II sind meist unregelmäßig zusammengesetzt und bilden eine ziemlich dünne, mattglänzende Haut, die gleichfalls sehr leicht zu Boden sinkt, dabei aber in sehr feine Teilchen zerfällt („Staubhaut"). Auch in den Hautinselchen von Rasse II kommen ausgedehnte Sproßverbände länglich ovaler bis langgestreckter wurstförmiger Zellen vor, doch sind diese lange nicht so häufig und ausgeprägt wie bei Rasse XII. Die Größe dieser Zellen ist im Mittel 14,0 : 5,2 μ, es treten aber Zellen von einer Größe bis zu 27,2 : 6,4 μ auf, also noch bedeutend längere wie bei Rasse XII. In drei Monate alten Kulturen, in denen auch ein mäßig starker Hautring sich gebildet hatte, waren ziemlich viele Dauerzellen mit ziemlich kräftiger Glykogenreaktion zu finden. Wurstförmige Zellen konnten im Ring und in der Haut selbst nur wenige gefunden werden, doch waren sie im Bodensatz (wahrscheinlich von zu Boden gesunkenen Hautteilchen herrührend) ziemlich zahlreich vorhanden. Die Größe dieser Zellen, die auch häufig keulenförmig waren, schwankte meist zwischen 12 : 3 μ und 9 : 2,5 μ.

Wahrscheinlich bilden also Rasse II und Rasse XII eine „zweite Hautgeneration".

In der Schnelligkeit der Hautbildung steht *Levure anamite* zwischen Rasse II und Rasse XII. Sie zeigte bei 25° C nach 7 Tagen die ersten Anfänge der Haut, d. h., es traten in den Hefeninselchen zuerst Zellen der „ersten Hautgeneration" auf. Das Optimum liegt bei 31° C (6 Tage). Bei Rasse XII begann die Hautbildung bei 25° C zwar auch erst am 7. Tage, doch wurden die Unterschiede bei höherer Temperatur ganz beträchtlich, so bei 45° C, wo *Levure anamite* nach 8 Tagen, Rasse XII bereits nach $2^1/_2$ Tagen die ersten Anzeichen einer Hautbildung aufwies. Bei Rasse II sind die entsprechenden Zeiten bei 25° C 9 Tage und bei 35° C 8 Tage. Bemerkenswert ist, daß bei höherer Temperatur (35° C) die Haut von *Levure anamite* (auch die von Rase II) nur mehr einen geringen Teil der Oberfläche bedeckte, während sie bei Rasse XII noch vollständig ausgebildet war. Auch konnte, besonders bei höherer Temperatur, beobachtet werden, wie vor dem Erscheinen der Zellen der „ersten Hautgeneration" langgestreckte, aber abnorm geformte Zellen auftraten (am häufigsten bei Rasse II), die für den Beginn der Hautbildung nicht herangezogen werden dürfen. Es handelt sich hier sehr wahrscheinlich um Zellen der Gärungsform, für welche die Existenzbedingungen ungünstig wurden. Die „erste Generation der Hautzellen" wird gewöhnlich erst einen Tag später gebildet.

III. Wachstumserscheinungen in Nährflüssigkeiten und auf festen Nährböden.

1. Wachstumserscheinungen in Nährflüssigkeiten.

a. Tröpfchenkulturen.

Die Tröpfchenkulturen wurden nach den Angaben von P. Lindner[11]) mit 8 verschiedenen Nährflüssigkeiten angefertigt und zwar mit: Gehopfter Würze (11—12° B), ungehopfter Würze

(11—12° B), Kartoffelwasser, Gelbrübenwasser, Weißkrautwasser, Weißrübenwasser, Hefenwasser + Saccharose und Hefenwasser + Dextrose. Es sei schon im voraus erwähnt, daß sowohl die Art der Sprossung als auch der Charakter der Kolonien in allen Nährlösungen im Prinzip übereinstimmten, es gilt also die nachfolgende Beschreibung der Wachstumserscheinungen in den Tröpfchenkulturen mit gehopfter Würze auch für die übrigen Nährflüssigkeiten.

Levure anamite sproßt in der allgemein bekannten Weise aus, indem meist an einem der beiden Pole der Mutterzelle die junge Tochterzelle angelegt wird. Selten entstehen an einem der beiden Pole gleichzeitig zwei, nie aber mehr junge Sprosse. In einigen Fällen wurde auch beobachtet, wie die Tochterzellen seitlich an der Mutterzelle hervorbrachen. Fünf Stunden alte Sproßverbände (bei 25° C) bestanden aus Zellen mit homogenem, sehr schwach lichtbrechendem Inhalte, der äußerst feinkörnig erschien. Vakuolen waren nicht oder nur schwer zu erkennen. Nach 25 Stunden machten die Kolonien den Eindruck derjenigen einer typischen wilden Hefe. Der homogene Inhalt der Zelle war relativ schwach lichtbrechend, die Kolonien infolgedessen blaß. Neben meist größeren Vakuolen waren auch einzelne Granula zu bemerken, jedoch lange nicht in dem Maße wie bei Kulturhefen nach derselben Zeit. In der Mitte der Kolonien waren die Sproßverbände bereits auseinandergefallen, die Zellen hatten sich dicht aneinandergelegt. Nur am Rande der Kolonien traten noch Sproßverbände auf. Riesenzellen, die stärker granuliert waren und meist sehr große Vakuolen besaßen, konnten öfter beobachtet werden. Bemerkt sei auch noch, daß sich häufig einzelne Zellen aus den Sproßverbänden losgelöst und von der Kolonie weiter entfernt hatten, wie das besonders bei wilden Hefen beim Zerfall der Sproßverbände infolge Erschütterungen häufiger beobachtet wird. Einige Wochen alte Kolonien zeigten im optischen Querschnitt meistens eine regelmäßige (rundliche) Form und waren konisch nach der Oberfläche der Tröpfchen hin gewachsen.

Von der Hefe Rasse II gilt hinsichtlich der Wachstumserscheinungen (nur in gehopfter Würze beobachtet) ungefähr dasselbe wie von *Levure anamite*. Rasse II macht hiebei gleichfalls den Eindruck einer typischen wilden Hefe. Die Sproßverbände sind locker und fallen bald auseinander. Das Loslösen einzelner Zellen von den Kolonien ist hier sehr häufig. Die Zellen sind mit großen Vakuolen versehen. Auch in den Kolonien von Rasse II kommen Riesenzellen vor. Rasse XII dagegen weist gegenüber *Levure anamite* und Rasse II merkliche Verschiedenheiten auf. Die Art der Sprossung ist dieselbe, jedoch sind die Sproßverbände viel ausgedehnter als bei den beiden anderen Hefen. Dann sind die Zellen von Rasse XII stärker granuliert und die Kolonien erinnern eher an Kultur- als an wilde Hefe. Ein Loslösen einzelner Zellen von den Sproßverbänden ist hier selten. Riesenzellen treten auch in den Kolonien von Rasse XII wieder auf.

b. Wachstumserscheinungen in grösseren Mengen von Nährflüssigkeiten.

Durch diese Versuchsreihe sollte festgestellt werden:

1. Ob sich die Hefe in den benützten Nährflüssigkeiten überhaupt entwickelt und ob dabei irgend welche charakteristische Erscheinungen auftreten, welche als diagnostische Merkmale (äußere Wachstumserscheinungen, Form und Größe der Zellen usw.) benützt werden können.

2. Welche Nährlösung nach ihrer Zusammensetzung für das Wachstum am günstigsten ist.

Die verwendeten Nährlösungen waren dieselben wie bei den Tröpfchenkulturen. Sie wurden in Mengen von je 30 ccm in kleine Erlenmeyerkolben abgefüllt und mit je einer Platinöse Bodensatzhefe einer Kultur von *Levure anamite* geimpft. Die Kölbchen blieben dann bei Zimmertemperatur (ca. 20° C) 4 Wochen lang stehen. Zur Ergänzung der Beobachtungen über die Wachstumserscheinungen wurden auch noch die mineralischen

Nährflüssigkeiten mit Zuckerzusatz bei den Assimilationsversuchen herangezogen. (S. S. 61.)

Bereits am ersten Tage nach der Beimpfung zeigte sich in sämtlichen Nährflüssigkeiten eine Entwicklung. Schwache bis deutliche Gärungserscheinungen konnten nur in den beiden Bierwürzen, ferner in Weißkraut- und Weißrübenwasser beobachtet werden. Bei Abschluß des Versuches (nach 4 Wochen) war weder in der Stärke der Entwicklung noch in irgend einer anderen äußerlichen Erscheinung ein merklicher Unterschied zwischen den einzelnen Nährflüssigkeiten festzustellen. Die Absätze waren fast überall gleich kräftig (ziemlich stark bis stark). Ring- und Hautbildung erfolgte in den beiden Würzen sowie in Weißrübenwasser. Letzteres verbreitete außerdem (besonders während der Gärung) einen intensiven Geruch nach Schwefelkohlenstoff. Ring- aber keine Hautbildung trat bei Kartoffel- und Weißkrautwasser auf; der Ring war besonders in letzterem kräftig entwickelt. Die Milch (bei den Tröpfchenkulturen nicht verwendet) war zwar trotz wiederholter Sterilisierung nicht frei von Bakterien, doch konnte trotzdem eine deutliche Hefenvegetation beobachtet werden. In den für die Assimilationsversuche verwendeten Zuckerlösungen traten außer Absätzen keine augenfälligen äußeren Erscheinungen auf. Die Bildung der Absätze ging in den mineralischen Zuckerlösungen langsamer vor sich als in den übrigen Nährflüssigkeiten, wo sie schon am dritten Tage ihre endgültige Stärke erreicht hatten. Naturgemäß war die Entwicklung in den Zuckerlösungen außerdem eine verhältnismäßig viel geringere.

Die Gestalt der Zellen einer jungen Kultur von *Levure anamite* ist in gehopfter Würze von 11—12° B kugelförmig oder oval (Taf. II, Fig. 4). Die Kugelform ist meist unter den kleinen Zellen vertreten. Die Zellgröße unterliegt starken Schwankungen und bewegt sich zwischen 4,0 : 4,0 μ und 11,2 : 9,6 μ. Vorherrschend sind Zellen von 7,5 : 6,7 μ. Riesenzellen kommen öfters vor. Die Zellwandung ist von normaler Dicke. Das Lichtbrechungsvermögen des Protoplasmas stimmt im allge-

meinen mit demjenigen der bisher bekannten Hefen überein. Granula sind nur wenig vorhanden, auch sind sie nicht besonders deutlich sichtbar. Die Vakuolen treten entweder in der Einzahl auf und sind dann meistens ziemlich groß oder es kommen zwei bis viele kleinere Vakuolen in einer Zelle vor. Die Riesenzellen enthalten meist sehr große Vakuolen. Am häufigsten sind die Zellen einzeln, selten zu größeren als vierzelligen Sproßverbänden vereinigt. *Levure anamite* besitzt also im Wesentlichen den Charakter wilder Hefen. (Ähnliche morphologische Eigenschaften zeigt die Hefe auch in frisch vergorener Maische). In 4 Wochen alten Würzekulturen bestand die Bodensatzhefe hauptsächlich aus den bezeichneten Zellformen im Hungerzustande. Auffällig waren zahlreiche Riesenzellen, die von einer großen Vakuole fast ganz erfüllt waren. Die Bodensatzhefe in den übrigen Nährflüssigkeiten stimmte mit derjenigen in Würze überein. Langgestreckte wurstförmige Zellen, von zu Boden gesunkenen Hautteilchen herrührend, kamen überall in geringerer oder größerer Anzahl vor. Die Haut und der Ring der Würzekulturen waren aus den früher beschriebenen Zellformen zusammengesetzt. Abweichend von jenen traten im Hefenring von Kartoffelwasserkulturen sehr viele rundliche Zellen mit scharf ausgeprägter Kronenbildung und zahlreiche abnorme Zellformen auf (Taf. II, Fig. 5). So beobachtete man keimschlauchartige Auswüchse von 64 μ und mehr Länge sowie keulenförmige, durch Querwände geteilte Zellen, wie sie bei der Keimung von Dauerzellen auftreten. Typische und reichliche Kronenbildung wurden auch im Hefenring von Weißkrautwasser festgestellt. Abnorme Zellformen waren hier seltener. Bei Weißrübenwasser wies besonders der Ring typische Kronenbildung auf. Abnorme Zellen, wie lange, keimschlauchartige Auswüchse, konnten besonders in der Haut öfter angetroffen werden. Die Zahl der toten Zellen war am größten in Kartoffelwasser und Weißkrautwasser. Im Zusammenhalt mit den abnormen Zellformen erscheinen also diese Nährböden für *Levure anamite* weniger geeignet als die übrigen. In

den Bodensätzen der mineralischen Nährlösungen traten vor allem zahlreiche rundliche Zellen mit typischer Kronenbildung auf. Etwas seltener war die letztere in den Laktose- und Raffinoselösungen. Die Sprossung unter Kronenbildung scheint wesentlich durch die Nährlösung bedingt zu sein.

Die äußeren Wachstumserscheinungen von Rasse II und Rasse XII stimmen im allgemeinen mit denjenigen der *Levure anamite* überein.

2. Wachstumserscheinungen in und auf festen Nährböden.

a. Einzellkulturen.

Die Einzellkulturen wurden in der allgemein üblichen Weise unter Zuhilfenahme der Böttcherschen feuchten Kammer in $10^0/_0$iger gehopfter Würzegelatine angelegt. Die Art der Sprossung von *Levure anamite* war ganz ähnlich wie in den Tröpfchenkulturen und die Zellen erschienen infolge der schwachen Granulation ziemlich blaß, erinnerten also wieder an wilde Hefe. Die bei 19^0 C während 4 Tagen gewachsenen Kolonien schlossen sich fast ausschließlich dem Typus II „unregelmäßige Kolonien mit regelmäßigem Kern" nach H. Will[25]) an. Die Maulbeerform trat gleichfalls, aber nicht so häufig auf. Möglicherweise erfolgte ein frühes „Auswachsen" der Kolonien, sodaß der ganz regelmäßige Typus nur für kurze Zeit bestand.

b. Stichkulturen.

Die Stichkulturen wurden in gehopfter, $10^0/_0$iger Würzegelatine angelegt, die sich in einer ca. 5 cm hohen Schicht in Reagensgläsern befand. Die Kulturen blieben bei $20—30^0$ C stehen. Nach 5 Tagen war der Stichkanal fast in seiner ganzen Länge bewachsen. Bei 2 Wochen alten Kulturen hatte sich ein den Riesenkolonien auf gehopfter Würzegelatine ähnlicher Oberflächenbelag gebildet, der sehr feine und zahlreiche radiale Streifen aufwies. Die Hefenkolonien reichten bis auf den Grund des Reagensglases und waren wie bei den meisten Hefen senk-

recht zum Stichkanal traubenförmig in die Gelatine hineingewachsen. *Levure anamite* verträgt also ein ziemliches Maß von Luftbeschränkung.

In drei Monate alten, bereits verflüssigten Stichkulturen traten langgestreckte, wurstförmige Zellen (Taf. II, Fig. 6) neben dauerzellenähnlichen Riesenzellen (Taf. II, Fig. 7) auf. Typische Dauerzellen waren selten.

Über die Stichkulturen von Rasse II und Rasse XII ist Ähnliches zu sagen wie über die von *Levure anamite.*

c. Kulturen in gleichmäßiger Verteilung der Hefe in der Gelatine.

In die 10%ige, verflüssigte Würzegelatine, welche sich in einer ca. 5 cm hohen Schicht in Reagensgläsern befand, wurde die Hefe in der üblichen Weise gleichmäßig verteilt.

Die Kulturen, welche man bei ca. 20° C aufstellte, waren nach 24 Stunden durch Vermehrung der Einsaat gleichmäßig getrübt. Am 2. Tage erfolgte jedoch durch Kohlensäureentwicklung eine Zerklüftung der Gelatine, wobei die Trübung stärker wurde. Auch diese Kulturen bewiesen, daß *Levure anamite* ein ziemliches Maß von Luftbeschränkung erträgt.

Rasse II und Rasse XII stimmten auch in den vorliegenden Kulturen mit *Levure anamite* vollkommen überein.

d. Riesenkolonien.

Unter den Wachstumserscheinungen auf festen Nährböden stehen die Riesenkolonien, sofern eine Unterscheidung verschiedener Gruppen von Hefen in Frage kommt, an erster Stelle. Die Konstanz der Wachstumserscheinungen der Riesenkolonien einer und derselben Hefenart auf dem gleichen Nährboden erhöht deren diagnostischen Wert. Bei Anwendung verschiedenartiger Nährböden zeigen sich zwar unter den Riesenkolonien derselben Hefe merkliche graduelle, doch niemals prinzipielle Unterschiede.

Die Anlage der Kolonien erfolgte nach dem allgemein

gebräuchlichen Verfahren. Die Temperaturen, bei welchen die Kolonien aufgestellt waren, betrugen im Durchschnitt 20° C, 14° C und 9° C. Bei 20° C wurden die Kulturen nach 4 Wochen, bei 14° C nach 10 Wochen und bei 9° C nach 3 Monaten untersucht. Die Nährböden enthielten alle 10% Gelatine.

Würzegelatine gehopft.

20° C: Oberflächenbelag flach ausgebreitet, zentrale Partie eingesenkt und glatt. Strombildung mehr oder minder scharf ausgeprägt. Anhänge auf der Unterseite ziemlich kräftig. Oberfläche matt. Hefenfarbe. Durchmesser der Kolonien 14 mm.

14° C: Aehnlich wie bei 20° C, jedoch schwach gewölbt. Anhänge schwach entwickelt. Durchmesser 18—19 mm.

9° C: Aehnlich wie bei 20° C, jedoch stark in die Höhe gewachsen. Durchmesser unten 4,5 mm, oben 8 mm, Höhe 4 mm.

Würzegelatine ungehopft.

Im allgemeinen mit den entsprechenden Kolonien auf gehopfter Würzegelatine übereinstimmend. (Taf. III, Fig. 1).

Kartoffelwassergelatine.

20° C: Kolonien bereits verschleimt und zum Teil verflüssigt. Durchmesser 13 mm.

14° C: (Wurden schon nach 6 Wochen untersucht, da bereits Anzeichen von Verschleimung auftraten). Oberflächenbelag in der zentralen Partie flach gewölbt und fein gekörnt. Strombildung nur am äußersten Rande sichtbar. Randpartie hellgrau, zentrale Partie etwas dunkler gefärbt. Anhänge schwach entwickelt. Oberfläche etwas schleimig glänzend. Durchmesser 11 mm.

9° C: Aehnlich wie die vorigen, jedoch viel stärker gewölbt. Farbe matt weißlich. Durchmesser 7 mm.

Gelbrübenwassergelatine.

20° C: Oberflächenbelag flach ausgebreitet. Strombildung nur an der Randpartie mehr oder weniger deutlich. Zentrale Partie mit zahlreichen „Kratern". Anhänge schwach entwickelt.

Oberfläche matt. Hefenfarbe. Durchmesser 15—16 mm. (Taf. III, Fig. 2).

14 ° C: Oberflächenbelag mäßig stark gewölbt. Zentrale Partie mit grossen „Kratern". Strombildung äußerlich nicht sichtbar. Anhänge kräftig entwickelt. Farbe der zentralen Partie gelblichbraun, die der Randpartie milchweiß. Durchmesser 20—22 mm.

9 ° C: Ziemlich stark in die Höhe gewachsen. Strombildung deutlich ausgeprägt, desgleichen radiale und konzentrische Streifung. Streifen dachziegelförmig übereinanderliegend. Oberfläche der Kolonien außerdem fein gekörnt. Anhänge mäßig stark entwickelt. Hefenfarbe. Durchmesser unten 10 mm, oben 5 mm, Höhe $4^1/_2$ mm.

Weißkrautwassergelatine.

20 ° C: Auf der Randpartie Oberflächenbedeckung fehlend, Kolonien deshalb nicht ganz normal entwickelt. Die äußerst kräftigen, traubenförmigen Anhänge zeigen daher deutlich sichtbare Strombildung. (Taf. III, Fig. 8). Helle Hefenfarbe. Durchmesser 12—14 mm.

14 ° C: Oberflächenbelag mäßig gewölbt. Zentrale Partie mit kleiner Einsenkung. Strombildung deutlich ausgeprägt. Anhänge kräftig entwickelt. Hefenfarbe. Durchmesser 20—21 mm. (Taf. III, Fig. 6).

9 ° C: Sehr stark in die Höhe gewachsen. Strombildung mehr oder weniger deutlich (besonders in der äusseren Randpartie). Anhänge sehr schwach entwickelt. Helle Hefenfarbe. Unterer Durchmesser 7 mm, oberer 3 mm, Höhe 5 mm.

Weißrübenwassergelatine.

20 ° C: Nicht normal entwickelt insofern, als ein Oberflächenbelag auf der äußersten Randpartie fehlt. Oberflächenbelag im allgemeinen flach ausgebreitet und glatt mit einzelnen Faltungen. Strombildung deutlich ausgeprägt. Anhänge sehr

kräftig entwickelt. Hefenfarbe. Durchmesser 12 mm. (Tafel III, Fig. 3).

14° C: Oberflächenbelag mäßig in die Höhe gewachsen, ausgeprägte Strombildung mit konzentrischer Streifung zeigend. Zentrale Partie fein gekörnt und kaum eingesenkt. Anhänge mäßig stark entwickelt. Hefenfarbe. Durchmesser 17—20 mm. (Tafel III, Fig. 4).

9° C: Sehr stark in die Höhe gewachsen und konzentrisch sowie radial gestreift. Strombildung mehr oder weniger deutlich sichtbar. Streifen dachziegelförmig übereinanderliegend. Oberer Teil der Kolonie fein gekörnt. Anhänge mäßig stark entwickelt. Hefenfarbe. Durchmesser unten 10 mm, oben 3 mm, Höhe 7 mm. (Tafel III, Fig. 5).

Hefenwassergelatine.

20° C: Oberflächenbelag flach. Zentrale Partie glatt, Randpartie grob gefaltet. Strombildung und Anhänge nicht sichtbar. Helle Hefenfarbe. Durchmesser 9 mm. (Tafel III, Fig. 7).

14° C: Zentrale Partie des Oberflächenbelages flach gewölbt und grob gekörnt. Randpartie sehr grob gefaltet und fein gekörnt. Strombildung nicht sichtbar. Anhänge sehr schwach entwickelt. Farbe trocken weiß. Durchmesser 10—11 mm.

9° C: Oberflächenbelag mäßig stark gewölbt. Zentrale Partie, flach tellerförmig vertieft. Randpartie hat die Form eines dicken Ringwulstes. Strombildung nicht sichtbar, desgleichen Anhänge. Farbe milchweiß, zentrale Partie etwas dunkler. Durchmesser 5—6 mm.

Die Riesenkolonien von *Levure anamite* weisen in ihren äusseren Wachstumserscheinungen (Anhänge und Strombildung) im allgemeinen die Charaktere der von H. Will[26]) aufgestellten Grundform Ia auf. Strombildung war allerdings bei einzelnen Kolonien, besonders bei denen auf Hefenwassergelatine, nicht deutlich sichtbar. Dass aber auch in diesem Falle das Wachstum nach der Grundform Ia erfolgte, ging aus dem Verlaufe

der Wachstumserscheinungen sowie aus dem Auftreten sichtbarer Anhänge in den bei 14° C gewachsenen Kolonien hervor. Am kräftigsten waren die Anhänge in Weißkraut- und Weißrübenwassergelatine entwickelt, demgemäß war hier auch die Strombildung sehr scharf ausgeprägt, d. h. die Ströme waren viel deutlicher voneinander getrennt als in den übrigen Kolonien. Bemerkenswert ist die Bildung von „Kratern" in den Kolonien auf Gelbrübenwassergelatine. Die bei 9° C gewachsenen Kolonien waren durchwegs hart, trocken und brüchig, während sie bei 20° C ziemlich weiche Beschaffenheit zeigten und öfter einen matten Glanz besaßen. Die Schnelligkeit des Wachstums war, soweit dies nach der Zunahme des Durchmessers der Riesenkolonien beurteilt zu werden vermag, auf allen Nährböden ziemlich gleich. Nur Hefenwassergelatine erschien ein ungünstiger Nährboden zu sein, denn der Durchmesser der Kolonien blieb weit hinter demjenigen der übrigen zurück. Daß die Kolonien bei niederer Temperatur stärker in die Höhe und weniger in die Breite wachsen, ist eine allgemeine Erscheinung.

Was die in den Riesenkolonien von *Levure anamite* auftretenden Zellformen anbetrifft, so besteht eine gewisse Übereinstimmung mit den Zellformen der Hautinselchen. Es bilden sich nämlich im Laufe des Wachstums der Riesenkolonien, ähnlich wie bei der Hautbildung, Zellgenerationen (hauptsächlich langgestreckte wurstförmige Zellen), die in der ausgesäten Hefe nicht vorhanden sind. Diese Zellen, in erster Linie die wurstförmigen, sind für die Gestaltung der Riesenkolonien von entscheidendem Einfluß. Die bei *Levure anamite* auftretenden Erscheinungen stimmen also in dieser Hinsicht mit denjenigen der Saccharomyceten überhaupt überein. In der zentralen Partie der Riesenkolonien herrschten fast auf allen Nährböden starkwandige und stark granulierte, rundliche bis ovale, manchmal auch anders geformte Zellen vor (Taf. II, Fig. 8), die sehr an Dauerzellen erinnerten, in einzelnen Fällen sicher auch Dauerzellen waren. Bemerkenswert ist, daß die Kraterbildungen

zum großen Teile aus dauerzellenähnlichen Zellen zusammengesetzt waren. In der zentralen Partie der Kolonien auf Weißkraut- und Weißrübenwassergelatine traten langgestreckte, meist abnorme Zellformen in den Vordergrund. In der Randpartie der Kolonien traten neben rundlichen und ovalen auch viel langgestreckte Zellen, von den Anhängen herrührend, auf. (Taf. II, Fig. 9). Die Zellen der Randpartie waren im allgemeinen merklich schwächer granuliert als die in der zentralen Partie. Auf Hefenwassergelatine, wo keine oder nur Spuren von Anhängen vorhanden waren, fehlten jene Zellen (die langgestreckten), in der Randpartie, die im übrigen fast aus den gleichen Zellformen wie die zentrale Partie zusammengesetzt war. Infolgedessen fehlte Strombildung. Bei Weißkraut- und Weißrübenwassergelatine war auch in der Randpartie die Zahl der abnorm geformten Zellen eine große. Die Anhänge der Riesenkolonien bestanden fast ausschließlich aus weit sich verbreitenden Sproßverbänden langgestreckter wurstförmiger Zellen, die kaum granuliert waren. (Taf. II, Fig. 10).

Die Riesenkolonien von Rasse II gehören gleichfalls dem Typus Ia an. Die auf gehopfter Würzegelatine gewachsenen Kolonien haben große Aehnlichkeit mit den entsprechenden von *Levure anamite*.

Rasse XII dagegen bildet Riesenkolonien vom Typus Ib. Sie unterscheiden sich von denjenigen der *Levure anamite* und Rasse II sehr deutlich. Vor allem sind bei diesen Kolonien die Ströme geteilt und scharf voneinander getrennt sowie kräftig entwickelt. Der Oberflächenbelag zeigt auf allen Kolonien zahlreiche Unebenheiten (Faltungen und Ringelungen). Die Riesenkolonien auf Würzegelatine haben die größte Aehnlichkeit mit denjenigen der untergärigen Bierhefe Stamm 6 (vergleiche H. Will[27], Tafel I, Fig. 3). In anatomischer Beziehung stimmen die Riesenkolonien sowohl von Rasse XII als auch von Rasse II mit denjenigen der übrigen Saccharomyceten überein.

C. Physiologie.

I. Generationsdauer.

Als Generationsdauer bei Bakterien ist die Zeitdauer, binnen welcher aus einer Bakterienzelle eine zweite (also eine neue Generation) hervorgeht, bezeichnet worden. Bestimmter wäre eine auf Grund der Untersuchungen von Brefeld[1]) und Prazmowski[16]) an dem Heubazillus gegebene Definition: Unter Generationsdauer hat man jene Zeit zu verstehen, innerhalb welcher ein aus der Teilung eines längeren Stäbchens hervorgegangenes Teilstäbchen solange heranwächst, bis es sich wieder teilt. Auf Sproßpilze übertragen, müßte die Definition folgendermaßen lauten: Generationsdauer ist diejenige Zeit, welche vom Beginn der Sprossung, durch welche eine neue Zelle angelegt wird, bis zu dem Zeitpunkte verstreicht, wo die inzwischen mehr oder weniger herangewachsene Zelle befähigt wird, selbst eine Tochterzelle zu bilden. Hoyer[8]), der mit verschiedenen Heferassen in dieser Richtung Versuche machte, geht von der Bedingung aus, daß die Sprossung der Hefe immer eine zweiteilige und nicht etwa eine drei- oder mehrteilige sei, d. h. daß aus einer Zelle nach einer bestimmten Zeit immer nur wieder eine neue Zelle hervorgehe. Das letztere trifft auch für *Levure anamite* in den meisten Fällen zu.

Die Versuche über die Generationsdauer dieser Hefe selbst wurden abweichend von Hoyer folgendermaßen ausgeführt: Mit 18 Stunden alter Bodensatzhefe wurden nach genügender Verdünnung in gehopfter Würze Adhäsionskulturen angelegt, sodaß die einzelnen Zellen ziemlich weit auseinander zu liegen kamen. Man brachte hierauf die Kulturen in den Thermostaten zu 26 °C. Nach ca. 1—2 Stunden waren genug Zellen vorhanden, die gerade die ersten Sprossungserscheinungen zeigten. Diese Zellen, und zwar nur solche mit je einer neu angelegten Zelle, wurden mittels eines Markeurs möglichst rasch bezeichnet und die Kulturen hierauf wieder zu 26° C gebracht. Nach einer bestimmten Zeit zählte man die neu entstandenen, ausgewach-

senen Zellen (S. nachst. Tabelle). Die Generationsdauer wurde berechnet nach der Formel $m = 2^{\frac{t}{x}}$ oder $x = \frac{log\ 2\ t}{log\ m}$, wo t die Zeitdauer des Versuches vom Aussprossen der Zellen an gerechnet, m die Zahl der im Durchschnitt aus einer Zelle gewachsenen Zellen und x die gesuchte Generationsdauer ist. (Rasse II und Rasse XII sind mituntersucht).

Hefe	Temperatur	Versuchsdauer Std.	Aus einer Zelle gewachsen	Im Durchschnitt aus einer Zelle	Generationsdauer
Levure anamite	26° C	8	14,14,16,16,16,16,16,16,16,16,16,16,16,24	16	2 Stunden
Rasse II	26° C	$6^1/_2$	13, 13, 14, 15, 15, 15, 16, 16, 16, 17, 17, 18	15,4	1St.39Min.
Rasse XII	26° C	$6^1/_2$	8, 9, 12, 13, 14, 15, 15, 16, 16, 16, 16	13,6	1 „ 43 „

II. Gärversuche.

1. Kleingärmethode.

Diese wurde nach den Angaben von P. Lindner[12]) ausgeführt. Zur Verwendung gelangten folgende Zuckerarten: Dextrose, Lävulose, Galaktose, Saccharose, Laktose, Maltose und Raffinose. Das Aussaatmaterial war auf $10^0/_0$iger, schräg erstarrter, gehopfter Würzegelatine bei ca. 20° C herangezüchtet worden und 5 Tage alt. Als Grundlösung diente neutrales Hefenwasser. Nach dem Impfen wurden die Kulturen bei 25° C aufgestellt, dort eine Woche lang belassen und während dieser Zeit täglich beobachtet. Das Ergebnis des Versuches ist in folgender Tabelle zusammengestellt (unter Berücksichtigung der Rassen II und XII).

Hefe	Dextrose	Lävulose	Galaktose	Saccharose	Laktose	Maltose	Raffinose	Blinder Versuch
Levure anamite	$+^1,+^1$	$+^1,+^1$	$+^2,+^2$	$+^1,+^1$	—,—	$+^4,+^4$	$+^2,+^2$	—,—
Rasse II	$+^1,+^1$	$+^1,+^1$	$+^2,+^2$	$+^1,+^1$	—,—	$+^1,+^1$	$+^2,+^2$	—,—
Rasse XII	$+^1,+^1$	$+^1,+^1$	$+^2,+^2$	$+^1,+^1$	—,—	$+^1,+^1$	$+^2,+^2$	—,

In dieser Tabelle bedeutet + = Vergärung, — = keine Vergärung. Das zweite + bezw. — bezeichnet die Resultate des Parallelversuches. Die dem + Zeichen beigesetzten Exponenten bezeichnen den Grad der Vergärung und zwar bedeutet: $+^1$ = starke Gärung (nach 24 Stunden ist der ganze Hohlraum des Objektträgers von einer Kohlensäureblase ausgefüllt); $+^2$ = mäßige Gärung (die Blase füllt nur ungefähr die Hälfte der Höhlung aus); $+^3$ = geringe Gärung (hier nicht aufgetreteten), d. h., in der Flüssigkeit treten nach der Zeit von 24 Stunden nur sehr kleine Blasen auf; $+^4$ = sehr geringe Gärung (nach wenigstens 4 Tagen Gasblasen in der Flüssigkeit).

Levure anamite vergärt also, mit Ausnahme von Milchzucker, sämtliche Zuckerarten, die geprüft wurden. Malzzucker wird sehr träge vergoren (in einem Versuche traten am 3. Tage Gasblasen auf). Rasse II und Rasse XII vergären ebenfalls alle der hier geprüften Zuckerarten außer Laktose, jedoch wird von ihnen die Maltose viel energischer angegriffen (am stärksten von Rasse II).

2. Gärversuche im Grossen mit Milchzucker.

Da mit Milchzucker bei der Kleingärmethode negative Resultate erzielt worden waren, stellte man mit dieser Zuckerart noch Gärversuche in größerem Maßstabe an. Hierzu wurde

neutrales Hefenwasser mit 6% chemisch reinem Milchzucker versetzt und in Mengen von je 100 ccm in Erlenmeyerkolben abgefüllt. Das 8 Tage alte Aussaatmaterial war wie bei der Kleingärmethode auf festem Nährboden herangezüchtet worden. Man trug davon je 2 erbsengroße Mengen in die Zuckerlösung ein. Die Versuche wurden bei Zimmertemperatur (ca. 20° C) aufgestellt und nach einem Monat abgeschlossen. Während dieser Zeit zeigten sich keine sichtbaren Gärungserscheinungen, obwohl zweifellos ein Wachstum stattgefunden hatte (Bodensatz, Hefenring, Sproßverbände). Möglicherweise konnten aber doch geringe Mengen von Alkohol gebildet worden sein und um diesen qualitativ zu ermitteln, bediente man sich dreier verschiedener Methoden: der refraktometrischen Bestimmung, der Jodoformreaktion nach Sieben und der Klöckerschen Methode.

Sowohl die refraktometrische Bestimmung als auch die Jodoformreaktion versagten. Zwar trat bei letzterer der charakteristische Jodoformgeruch auf, aber der gelbe Niederschlag blieb auch nach längerem Stehenlassen der Flüssigkeit aus. Die Gegenwart von Alkohol war also nicht sicher. Zuverlässiger als die genannten Methoden erwies sich die von Klöcker[9] angegebene, welche sich auf die schon von Pasteur gemachte Beobachtung bei der Destillation alkoholhaltiger Flüssigkeiten stützt. Wenn die zu prüfende Flüssigkeit Alkohol enthält, so macht sich dieser in Form charakteristischer öliger Tropfen im Kühlrohre bemerkbar. Die Erscheinung ist markanter, wenn man das erste Destillat der Versuchsflüssigkeit verwendet. Noch besser ist es, vom ersten Destillat 15—20 ccm abzudestillieren und diese für den Versuch zu nehmen. Da Klöcker die Beobachtung machte, daß sich selbst überlassene Nährflüssigkeiten, auch wenn sie steril waren, dennoch geringe Mengen Alkohol enthalten können, ist es unbedingt notwendig, jene vor der Impfung nach dem Verfahren von Klöcker auf etwa vorhandenen Alkohol zu prüfen. Es geschah dies auch im vorliegenden Falle mit dem mit Zucker versetzten Hefenwasser

unmittelbar vor dem Impfen, wobei keine Spur von Alkohol nachgewiesen werden konnte. Nach einem Monat wurden die geimpften Versuchsflüssigkeiten, und zwar zunächst deren erstes Destillat, auf Alkohol geprüft. Auch hierbei trat keine Reaktion auf. Erst im zweiten Destillate konnten die öligen Tropfen in ziemlicher Höhe im Kühlrohre ganz deutlich beobachtet werden.

Zur Sicherheit wurde noch eine zweite Versuchsreihe aufgestellt, die bereits nach 14 Tagen zum Abschluß gelangte; denn in der Zeit von einem Monat konnte leicht etwas Alkohol verzehrt worden sein. Bei diesen Versuchen erschien die Reaktion schon im ersten Destillate ganz deutlich, im zweiten natürlich noch besser. Somit wird also Milchzucker von *Levure anamite* in ganz geringen Mengen vergoren, was jedoch für die Praxis nicht in Betracht kommt.

Bei den mit Rasse XII angestellten Versuchen waren die öligen Tropfen in sämtlichen Destillaten sehr gut zu sehen, bei Rasse II dagegen konnte in einem nach 14 Tagen abgeschlossenen Versuche erst im zweiten Destillate mit Sicherheit Alkohol festgestellt werden.

3. Vergärungsgrad.

Ermittelt wurden der scheinbare und der wirkliche Vergärungsgrad in gehopfter Würze nach der Formel

$$V = \frac{E - e}{E} \cdot 100 ,$$

wobei E den Extraktgehalt vor der Gärung, e denjenigen nach der Gärung anzeigt.

Zur Ausführung des Versuches befüllte man Gärflaschen mit 300 ccm einer gehopften Würze vom spezifischen Gewichte 1,0521 (bei 15 ° C) oder, umgerechnet, mit einem Extraktgehalt von 12,84 % (oder 13,49 g in 100 ccm) und impfte mittels einer sterilen Pipette je 3 Tropfen der Bodensatzhefe einer Kultur von *Levure anamite* ein. Die Flaschen wurden hierauf im Thermostaten bei 25 ° C aufgestellt und blieben dort bis

zur Gewichtskonstanz (12 Tage) ruhig stehen. Nach dieser Zeit bestimmte man den Vergärungsgrad (auch den von Rasse II und Rasse XII).

Scheinbarer Vergärungsgrad:

	Levure anamite	Rasse II	Rasse XII
Extraktgehalt vor der Gärung	12,84%	12,84%	12,84%
„ nach „ „	5,5%	3,7%	3,8%
Vergorener Extrakt:	7,34	9,14	9,04

Daraus berechnet sich der scheinbare Vergärungsgrad wie folgt:

Levure anamite	Rasse II	Rasse XII
57,16	71,18	70,40

Wirklicher Vergärungsgrad (Alkohol und Extrakt wurden mittels des Pyknometers bestimmt):

	Levure anamite	Rasse II	Rasse XII
Extraktgehalt vor der Gärung:	12,84%	12,84%	12,84%
„ nach „ „	7,73%	5,71%	5,45%
Vergorener Extrakt:	5,11	7,13	7,39

(Nach Abdestillieren des Alkohols)

Der wirkliche Vergärungsgrad ist demnach:

Levure anamite	Rasse II	Rasse XII
39,79	55,53	57,55

An Alkohol wurden gefunden:

Bei *Levure anamite* 3,78, bei Rasse II 4,78 und bei Rasse XII 4,80 g in 100 ccm.

Daß *Levure anamite* im Vergleich zu Rasse II und Rasse XII einen so niedrigen Vergärungsgrad besitzt, ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß der Zucker in der Würze hauptsächlich in Form von Maltose vorhanden ist, die ja, wie die Kleingärmethode bewiesen hat, von *Levure anamite* ziemlich schwer angegriffen wird.

4. Gärverlauf.

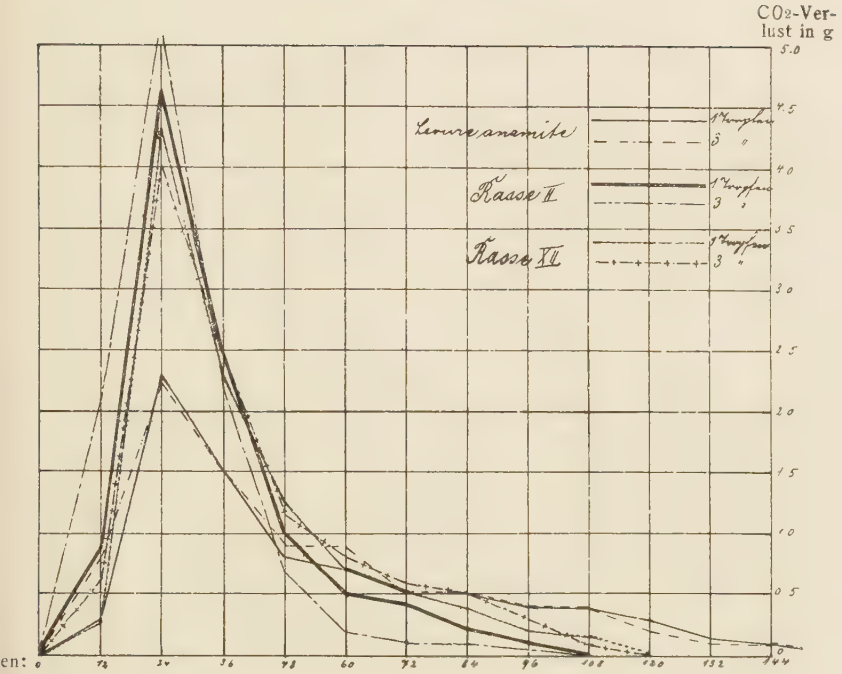
a. In gehopfter Würze.

Zur Bestimmung des Gärverlaufes befüllte man, wie beim vorhergehenden Versuche, Gärflaschen mit je 300 ccm gehopfter Würze. Letzere hatte eine Konzentration von 14 ° B. Die Impfmenge betrug bei einer Versuchsreihe 3 Tropfen, bei der andern 1 Tropfen. Das Impfmaterial stammte aus der Bodensatzhefe einer zwei Tage alten Kultur von *Levure anamite*. Aufgestellt wurden die Kulturen bei 33 ° C, da diese Temperatur nahe der optimalen liegt (in der Brennereipraxis vergärt *Levure anamite* bei einer Temperatur von 35—38 ° C). Der Verlauf der Gärung wurde durch Wägen der Gärflaschen nach je 12 Stunden bis zur Gewichtskonstanz (Gewichtsabnahme innerhalb 12 Stunden nur mehr 0,05—0,1 g) bestimmt. Beim Wägen vermied man eine stärkere Bewegung der Flüssigkeit.

Aus nachstehender Tabelle sowie den Kurven ist der Gärverlauf (auch der von Rasse II und Rasse XII) zu ersehen.

CO_2-Verlust in g

	Gewogen nach Stunden	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	Gesamt-CO_2-Verlust
1 Tropfen Einsaat	Levure anamite	0.3	2.3	1.5	0.8	0.7	0.5	0.5	0.4	0.4	0.3	0.15	0.1	7.95
3 Tropfen Einsaat		0.8	2.25	1.5	0.9	0.9	0.5	0.5	0.4	0.4	0.2	0.1	0.1	8.55
1 Tropfen Einsaat	Rasse II	0.85	4.6	2.45	1.0	0.5	0.4	0.2	0.1	—	—	—	—	10.1
3 Tropfen Einsaat		2.1	5.2	2.2	0.7	0.2	0.1	0.1	0.05	—	—	—	—	10.65
1 Tropfen Einsaat	Rasse XII	0.25	4.3	2.6	1.25	0.7	0.5	0.4	0.2	0.15	—	—	—	10.35
3 Tropfen Einsaat		0.6	4.0	2.5	1.15	0.8	0.6	0.5	0.3	0.1	—	—	—	10.55



Kurven, den Gärverlauf in gehopfter Würze darstellend

Die durch die Gärung erzeugte Alkoholmenge betrug bei *Levure anamite* 4,0 g in 100 ccm (1 Tropfen Einsaat) und 4,14 g in 100 ccm (3 Tropfen Einsaat), bei Rasse II und Rasse XII war sie in beiden Fällen etwas höher als 5,0 g in 100 ccm. Der Verlauf der Gärung war bei *Levure anamite* ein sehr träger, was, wie schon früher erwähnt wurde, wahrscheinlich auf den hauptsächlich in Form von Maltose vorhandenen Zucker zurückzuführen ist. Bei 3 Tropfen Hefeneinsaat war die Angärung naturgemäß stärker wie bei 1 Tropfen, sonst aber war der Verlauf der Gärung in beiden Fällen ziemlich gleich.

b. In Maismaische.

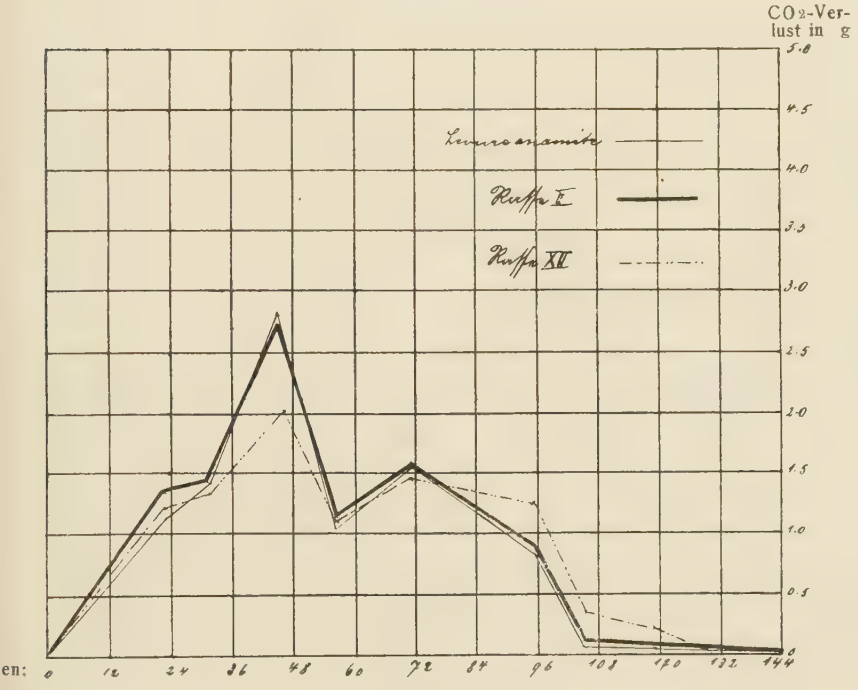
Die wenig günstigen Ergebnisse, welche die Versuche über den Gärverlauf von *Levure anamite* in gehopfter Würze ergaben

und die Überlegung, daß sich die Hefe schon seit längerer Zeit in den Amylobrennereien praktisch erprobt hat, legten den Gedanken nahe, daß der Gärverlauf bei Verwendung von Maischen, wie sie in der Brennereipraxis gebraucht werden, energischer und die Vergärung eine höhere sei. Bei den neuen Versuchen wurde eine Methode von Boidin[15]) zur Bestimmung des Stärkewertes durch Gärung benützt, wobei die Intensität des Dämpfens etwas variiert wurde, um eventuell bessere Aufschließung und Verflüssigung des verwendeten Mais zu erzielen.

30 g Mais wurden möglichst fein gemahlen und in einem Glaskolben mit 150 ccm destilliertem Wasser und 20 ccm Weinsäurelösung (84 g Weinsäure auf 1 l Wasser) versetzt. Zur Verkleisterung des Gemenges tauchte man hierauf den Kolben in siedendes Wasser, solange, bis jene gut und gleichmäßig erfolgt war. Nun dämpfte man mit Watteverschluß bei $1^1/_2$ Atmosphären 1 Stunde lang. Nach dem Erkalten der Masse setzte man zur Neutralisation der Weinsäure 1,25 g sterilisierten kohlensauren Kalk zu und säte hierauf in sterilem Wasser aufgeschlämmte Pilzsporen (eine Platinöse) aus. Nachdem man den Glaskolben außer mit dem Wattepropfen noch mit einem Gärverschluß versehen hatte, überließ man das Ganze in einem Thermostaten bei 30° C sich selbst. Nach 24—36 Stunden waren die Pilzentwicklung und Verzuckerung soweit vorgeschritten, das man die Einsaat der Hefe (eine Platinöse vom Bodensatze einer 2 Tage alten Würzekultur) vornehmen konnte. Im übrigen wurde wie bei den Versuchen mit Würze gearbeitet, nur geschah diesmal das Wägen der Kulturen nicht in gleichmäßigen Zeiträumen. Bemerkt sei auch noch, daß die Masse nach jedesmaligem Wägen schwach bewegt wurde, um die Pilze womöglich mit allen Teilen derselben in Berührung zu bringen. Der Verlauf der Gärung ist aus umstehender Tabelle sowie den Kurven ersichtlich. Die hier angegebenen Zahlen gelten erst von dem Zeitpunkte ab, wo die Hefe ausgesät wurde. Die Gewichtsabnahme während des Zeitraumes zwischen Pilz- und Hefenaussaat betrug nur 0,08—0,12 g und ist hier außer Acht gelassen.

CO_2-Verlust in g

Gewogen nach Stunden	23	$31^1/_2$	$46^1/_2$	$55^1/_2$	71	95	$104^1/_2$	119	128	143	152	Gesamtverlust an CO_2
Levure anamite	1.12	1.43	2.79	1.01	1.53	0.82	0.12	0.11	0.03	0.07	—	9.03
Rasse II	1.36	1.46	2.21	1.14	1.56	0.90	0.19	0.13	0.06	0.09	0.02	9.12
Rasse XII	1.22	1.32	2.01	1.11	1.42	1.23	0.35	0.26	0.09	0.09	0.05	9.15



Kurven, den Gärverlauf in Maismaische darstellend

Die Ausbeute vom Kilogramm Stärke (Stärkegehalt des Mais 62,3%) betrug bei *Levure anamite* 59,76 Literprozente, bei Rasse II 61,05 und bei Rasse XII 60,40 Literprozente. Die Maische war bei *Levure anamite* bis auf 2,7° B, bei den Rassen II und XII ist auf 2,4° B vergoren (wirkliche Vergärung). Die mit Jod versetzte Schlempe zeigte bei erstgenannter Hefe rotbraune, bei Rasse II violette und bei Rasse XII rotviolette Farbe, die Verzuckerung war also im allgemeinen nicht besonders gut. Auch bei der Alkoholausbeute hätte man, aus dem Stärkegehalt des Mais zu schließen, auf 62 bis 63 Literprozente rechnen dürfen. Jedenfalls muß aber hervorgehoben werden, daß *Levure anamite* in den Versuchen mit Maismaische erheblich bessere Resultate lieferte als in Würze, daß aber auch in ersteren Versuchen noch nicht die für *Levure anamite* günstigsten Bedingungen, wie sie der Großbetrieb tatsächlich bietet (Lüftung und Temperatur von 36—28° C) vorlagen, worauf die niedrigen Ausbeuten wohl in erster Linie zurückzuführen sind.

Zur Kontrolle stellte man noch einen Versuch mit einer an der Lehr- und Versuchsbrennerei der Kgl. Akademie Weihenstephan zur Beimpfung des Amylobottichs verwendeten *Levure anamite* auf, der bessere Resultate lieferte. Der Gärprozeß verlief bei dieser Hefe energischer als bei der ständig in Würze gezüchteten *Levure anamite* und die Alkoholausbeute betrug hier 61,48 Literprozente. Möglicherweise wurde durch das fortwährende Weiterzüchten der Hefe in Würze deren Gärkraft etwas geschwächt.

Aus diesem zweiten Versuche ist ohne weiteres ersichtlich, daß bei Vorhandensein günstiger Bedingungen die *Levure anamite* in ihrem praktischen Werte keinesfalls, wie man aus den Gärversuchen in gehopfter Würze hätte schließen können, gegen Rasse XII und noch viel weniger gegen Rasse II, die ja gegen hohe Temperaturen weniger widerstandsfähig ist, zurücksteht. Da Rasse XII ebenso hohe Temperaturen wie *Levure anamite* ertragen kann, wäre es übrigens interessant, wenn mit ersterer versuchsweise in der Praxis des Amyloverfahrens gearbeitet würde.

5. Gärungsform.

(Ober- oder Untergärung).

Zur Bestimmung der Gärungsform wurden zylindrische Gefäße von 41 cm Höhe und $3^1/_2$ cm lichter Weite bis zu ungefähr $^1/_5$ ihrer Höhe mit gehopfter Würze von 11,5 °B befüllt und mit ziemlich viel Bodensatzhefe beschickt. Nach guter Vermischung von Hefe und Würze wurden die Gefäße bei Zimmertemperatur (20—22 °C) aufgestellt. Die am zweiten Tage auftretenden Erscheinungen waren kurz folgende:

Gärverlauf sehr träge, schwacher Hefenauftrieb. Hefendecke mäßig stark, kein eigentlicher Hefenring. Schaumbildung mäßig stark, Würze stark getrübt, mäßiger Bodensatz.

Der Versuch wurde auf die gleiche Weise wiederholt, nur kamen diesmal als Aussaatmaterial die auf der Flüssigkeitsoberfläche sowie im Bodensatz befindlichen Hefenmassen des ersten Versuches zur Verwendung. Die Erscheinungen waren die gleichen wie das erste Mal, nur zeigten sie sich jetzt in verstärktem Maße und ließen deutlich den obergärigen Charakter der *Levure anamite* erkennen. Da diese zudem beim Schütteln mit Wasser in letzterem staubig verteilt blieb, so unterliegt ihre Zugehörigkeit zur Gruppe der obergärigen Hefen keinem Zweifel.

Rasse II und Rasse XII, die einen merklich stärkeren Auftrieb als *Levure anamite* besaßen, zeigten gleichfalls Obergärung und beim Schütteln mit Wasser staubigen Charakter.

III. Assimilation in mineralischen Nährlösungen.

1. Kohlehydrate.

Die folgenden Versuche wurden nach P. Lindner[13]) und Saito[13]) ausgeführt:

Als Grundlösung diente eine Lösung von 0,025 % Mg SO_4, 0,5 % KH_2 PO_4 und 0,5 % Asparagin in Leitungswasser. Hierzu wurden 5 % der zu prüfenden Zucker gegeben. Von den hexosehaltigen Nährlösungen füllte man je 5 ccm in Freudenreichkölbchen ab und sterilisierte zweimal je $^1/_2$ Stunde im strömenden Dampfe. Die polyosehaltigen Nährlösungen jedoch wurden, um eine durch Erhitzen eventuell eintretende hydrolytische Spaltung zu vermeiden, folgendermaßen behandelt: Man sättigte je 100 ccm dieser Nährflüssigkeiten mit Chloroform und schüttelte möglichst oft und kräftig um. Nach einigen Tagen wurden die so behandelten, vom Chloroform abgegossenen Nährlösungen in Mengen von je 5 ccm auf Freudenreichkölbchen abgefüllt und noch eine Woche bei gewöhnlicher Temperatur stehen gelassen. Nach dieser Zeit erwiesen sie sich meist frei von Infektion. Die Heranzüchtung des Impfmaterials erfolgte auf 10 %iger gehopfter Würzegelatine bei 16° C. Alter der Einsaat 8 Tage. Die Impfmenge war so bemessen, daß die Flüssigkeit nach Verteilung der Hefe gerade getrübt wurde. Die geimpften Kulturen blieben 10 Tage bei 25° C stehen. Die Stärke der Hefenentwicklung nach dieser Zeit wurde durch Zahlen ausgedrückt.

	Dextrose	Lävulose	Galaktose	Saccharose	Maltose	Laktose	Raffinose
Levure anamite	2	2	3	3	3	2	3
Rasse II	2	1	2	2—3	3	1—2	3
Rasse XII	2	2	2—3	3	3	2—3	3

3 heißt, die Entwicklung war so kräftig, daß die Flüssigkeit beim Schütteln sehr stark getrübt wurde, 2 ist gleichbedeutend mit einer mäßigen Trübung und 1 gleichbedeutend mit schwacher Trübung. Natürlich wurde die Entwicklung in den Zuckerlösungen verglichen mit Kulturen ohne Zuckerzusatz, in denen aber kaum eine Trübung zu bemerken war. Aus vorstehender Tabelle sind die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zu ersehen (einschließlich derjenigen von Rasse II und Rasse XII).

Am günstigsten für die Entwicklung dieser Hefen scheinen Raffinose und Maltose zu sein, da hier nicht nur die Trübung am stärksten war, sondern auch die Zellen die kräftigste Entwicklung zeigten.

Der Umstand, daß Asparagin außer Stickstoff- auch noch Kohlenstoffquelle ist, machte es notwendig, einen zweiten Versuch anzustellen, in dem als Stickstoffquelle $(NH_4)_2\ SO_4$ verwendet wurde. Die Nährlösung hatte in diesem Falle folgende Zusammensetzung: 1% $(NH_4)_2\ SO_4$, $0{,}8\%$ $KH_2\ PO_4$, $0{,}3\%$ $Mg\ SO_4$, $0{,}05\%$ KCl. Als Lösungsmittel diente destilliertes Wasser. Im übrigen war die Versuchsanstellung die gleiche wie bei der ersten Reihe. Ergebnisse siehe folgende Tabelle.

	Dextrose	Lävulose	Galaktose	Saccharose	Maltose	Laktose	Raffinose
Levure anamite	1	1	1	2	3	2	3
Rasse II	1—2	1	2	2	2	1	3
Rasse XII	2	1	2	2	2	2	3

Die Zahlen dieser Tabelle, verglichen mit denjenigen der vorhergehenden, lassen erkennen, daß bei Gegenwart von Asparagin

in der Nährlösung im allgemeinen doch eine etwas kräftigere Entwicklung stattfindet als bei $(NH_4)_2\ SO_4$ als Stickstoffquelle.

Beide Versuchsreihen haben aber bewiesen, daß sämtliche verwendete Zuckerarten von *Lecure anamite* assimiliert werden, und zwar sowohl durch die Stärke der Trübungserscheinungen als auch durch den mikroskopischen Befund der Bodensätze, in denen sich Sproßverbände und typische Kronenbildung vorfanden. Jedenfalls hatte also eine Vermehrung stattgefunden. Jene Zucker werden demnach nicht nur vergoren (Milchzucker ausgenommen) sondern auch assimiliert.

Dasselbe gilt von den Rassen II und XII.

2. Alkohole.

Auch diese Versuche wurden analog den Lindnerschen[14]) gemacht:

Enghalsige Erlenmeyerkolben von 150 ccm Fassungsvermögen wurden mit je 50 ccm einer Nährlösung von folgender Zusammensetzung (nach Lindner) beschickt: 0,025% Mg SO_4, 0,5% $KH_2\ PO_4$ und 0,5% $(NH_4)_2\ SO_4$ in Leitungswasser gelöst. Nach erfolgter Sterilisation und einigen Tagen Lüftung setzte man die Alkohole sowie das Impfmaterial zu. Zur Verwendung kamen Methyl-, Äthyl-, Propyl-, Butylalkohol und Glycerin. Das 6 Tage alte Impfmaterial hatte man auf gehopfter Würzegelatine herangezüchtet und trug hiervon soviel in die Versuchsflüssigkeiten ein, daß diese leicht getrübt wurden. Die Menge des zugesetzten Alkohols betrug für Methylalkohol, Äthylalkohol und Glycerin je 2%, für Propyl- und Butylalkohol je 6 Tropfen (ungefähr 0,25%) und für Amylalkohol je 3 Tropfen (ungefähr 0,12—0,15%) zu 50 ccm Nährlösung. Sowohl bei 24° C als bei 8—9° C stellte man je eine Versuchsreihe auf. Bei Abschluß der Versuche (nach 4 Wochen) konnte nur in den mit Glycerin versetzten Nährlösungen ein schwaches Wachstum beobachtet werden, alle anderen Kulturen zeigten gegenüber den Kontrollversuchen ohne Alkoholzusatz keine sichtbar stäkere

Entwicklung der Hefe. *Levure anamite* assimiliert also von den hier in Frage stehenden Alkoholen in mineralischer Nährlösung Glycerin und auch dieses bloß in geringem Maße.

Dasselbe ist von Rasse II und Rasse XII zu sagen, bei welchen schon Lindner bei seinen Versuchen mit Äthylalkohol ein Fragezeichen vermerkt.

IV. Wachstumsgrenzen bei hoher und niedriger Temperatur.

Die beiden Wachstumsgrenzen suchte man für folgende Nährlösungen zu bestimmen: Gehopfte und ungehopfte Würze (11,5° B), neutrales Hefenwasser + 10% Dextrose, neutrales Hefenwasser + 10% Saccharose, Nährlösung nach Hansen, Kartoffelwasser, Gelbrübenwasser, Weißrübenwasser und Weißkrautwasser. Diese Nährflüssigkeiten wurden zur Bestimmung der oberen Grenze in Mengen von je 10 ccm auf Freudenreichkölbchen verteilt, sterilisiert und hierauf mit kräftiger Bodensatzhefe geimpft. Je 2 Tropfen dieser Hefe wurden mittels einer sterilen Pipette in je ein Kölbchen eingetragen und darin gut verteilt. Von dieser Mischung impfte man je 2 Tropfen in je 2 Kölbchen einer jeden Nährflüssigkeit ein und führte mit dieser Verdünnung den Versuch durch. Von H. Will wurden nach noch nicht veröffentlichten Versuchen auf diese Weise die genauesten Resultate bei Bestimmung der oberen Wachstumsgrenze erzielt. Man stellte die Kulturen bei verschiedenen Temperaturen (in Betracht kommen hier nur 39,5° C, 41,6° C und 43° C) auf und beobachtete sie dort 10 Tage lang. Zeigte sich bei den betreffenden Temperaturen nach dieser Zeit keine sichtbare Entwicklung, so wurde die Flüssigkeit bis auf einen geringen Rest, in dem sich die Bodensatzhefe befand, abgegossen und durch gehopfte Würze ersetzt. Dann stellte man die Kulturen bei 25° C auf, um zu sehen, ob sämtliche Zellen abgetötet worden waren.

Bei 39,5° C. trat in sämtlichen Nährflüssigkeiten noch leb-

haftes Wachstum ein, während bei 41,6° C in den Hefenwasserzuckerlösungen sowie in Hansenlösung, Weißrüben- und Weißkrautwasser sämtliche Zellen abgetötet waren. Es liegt also für diese Nährlösungen die obere Wachstumsgrenze zwischen 39,5° C und 41,6° C. In Würze, Gelbrüben- und Kartoffelwasser erfolgte erst bei 43° C eine Abtötung sämtlicher Zellen. Die Grenze befindet sich also in letzterem Falle zwischen 41,6° C und 43° C.

Die untere Wachstumsgrenze konnte nicht bestimmt werden, da bei den zur Verfügung stehenden Temperaturen von 0—2° C noch kräftige Entwicklung stattgefunden hatte.

Bemerkt sei, daß Rasse XII in Bezug auf die obere Wachstumsgrenze vollkommen mit *Levure anamite* übereinstimmt. Für Rasse II liegt diese Grenze um 1—2° C tiefer.

V. Widerstandsfähigkeit gegen Erhitzen.

Bei den Erhitzungsversuchen folgte man den Angaben von H. Will,[18]) wobei die in der Tabelle verzeichneten Flüssigkeiten benützt wurden. Die Erhitzungsdauer betrug $^1/_2$ Stunde. Das Impfmaterial war in der üblichen Weise auf 10%iger, gehopfter Würzegelatine während 8 Tagen bei 20° C herangezüchtet worden.

	Gehopfte Bierwürze (11,5° B)			Ungehopf. Bierwürze (11,5° B)			Brunnenwasser			Hansenlösung			Hefenwasser + 6% Dextrose			Hefenwasser + 6% Saccharose		
Temperat. in °C	52°	54°	56°	52°	54°	56°	52°	54°	56°	52°	54°	56°	50°	52°	54°	48°	50°	52°
Entwickl. nach Tagen bei 25° C	1	2	—	1	3	—	1	2	—	1	3	—	1	3	—	2	2	—

Bei den Versuchen mit Brunnenwasser wurde nach dem Erhitzen der größte Teil des Wassers abgegossen, durch gehopfte Bierwürze ersetzt und dann die Kulturen zu 25° C gebracht.

Mit Ausnahme der Zuckerlösungen liegt also für die genannten Versuchsflüssigkeiten die Abtötungstemperatur zwischen 54° C und 56° C. Am wenigsten widerstandsfähig erwiesen sich die Zellen in Hefenwasser + 6% Saccharose, wo sie schon zwischen 50° C und 52° abstarben.

Rasse XII erträgt im großen ganzen die gleichen Temperaturgrade wie *Levure anamite*, bei Rasse II dagegen sind die Abtötungstemperaturen um einige Grade niedriger, diese Hefe ist also gegen Erhitzen empfindlicher.

VI. Entwicklungshemmung und Abtötung durch verschiedene Alkohole.

Durch den Versuch sollte ermittelt werden, welche Mengen verschiedener Alkohole zu Würze als Nährlösung zugesetzt werden müssen, um unter gleichen Verhältnissen einerseits die Entwicklung der Hefe zu hemmen und die Gärungserscheinungen aufzuheben, andererseits die Zellen abzutöten. Abgesehen von Glycerin stellte man die Versuche mit den gleichen Alkoholen wie bei den Assimilationsversuchen an. Die Grundlösung war gehopfte Bierwürze von 11,5° B. Diese wurde in Mengen von genau 10 ccm in Freudenreichkölbchen abgefüllt. Mittels einer genau eingeteilten, sterilen Pipette erfolgte dann der Zusatz der entsprechenden Alkoholmengen. Das Impfmaterial entnahm man dem Bodensatze einer 2 Tage alten Würzekultur von *Levure anamite*. Von diesem erhielt jedes Kölbchen mittels steriler Kapillare je 3 Tropfen. Die Kulturen blieben hierauf bei ca. 24° C 10 Tage stehen; nach dieser Zeit wurden sie untersucht.

Um jene Mengen Alkohol zu bestimmen, bei deren Zusatz sämtliche Zellen abgetötet worden waren, wurde von den Kulturen, in welchen eine sichtbare Entwicklung nicht mehr stattgefunden hatte, die mit Alkohol versetzte Würze abgegossen und durch frische ohne Alkoholzusatz ersetzt. Erfolgte nach 14 Tagen keine Entwicklung, so konnte angenommen werden

daß unter den gegebenen Verhältnissen durch die betreffenden Alkoholmengen sämtliche Zellen abgetötet worden waren.

Die Abtötung sämtlicher Zellen in den Kulturen erfolgte bei nachstehenden Alkoholzusätzen:

Methylalkohol 33%, Aethylalkohol 21%,
Propylalkohol 9%, Butylalkohol 5%,
Amylalkohol 2,5%.

Für die Aufhebung der Vermehrungsfähigkeit wurden folgende Grenzwerte ermittelt:

Methylalkohol 27%, Aethylalkohol 19%,
Propylalkohol 7%, Butylalkohol 3%,
Amylalkohol 1,5%.

Die Grenzwerte für das Auftreten sichtbarer Gärungserscheinungen waren:

Methylalkohol 15—17%, Aethylalkohol 10%,
Propylalkohol 3—5 %, Butylalkohol 1—3%,
Amylalkohol ca. 0.5%.

Dabei muß jedoch erwähnt werden, daß die Gärungserscheinungen bei kleinen Mengen von Versuchsflüssigkeiten nicht immer deutlich auftreten, um hier eine scharfe Grenze festsetzen zu lassen. Genau sind obige Resultate bei Aethylalkohol, mit dem die Versuche wegen ihrer praktischen Bedeutung auch in größeren Mengen von Bierwürze (100 ccm) angestellt wurden.

Aus den mitgeteilten Zahlen ist deutlich zu ersehen, daß die entwicklungshemmende Wirkung der Alkohole mit der Anzahl der in ihrem Moleküle auftretenden Kohlenstoffatome sich verstärkt.

Rasse II und Rasse XII weichen in ihrem Verhalten gegen Alkohole nur wenig von *Lerure amamite* ab. Bemerkenswert ist vielleicht, daß Rasse XII, besonders bei Zusatz von Aethylalkohol und zwar nur solange als noch Gärung eintritt, einen Bodensatz bildete, der aus einer zusammenhängenden, sehr grob gefalteten, durchscheinenden Haut bestand.

VII. Gelatineverflüssigung.

Zur Prüfung der Fähigkeit Gelatine zu verflüssigen, wurden Stichkulturen herangezogen. Nach einem Monat war die Gelatine in diesen von weicher Beschaffenheit, wahrscheinlich zum Teil infolge der hohen Zimmertemperatur (20—24 °C). Ein Vergleich mit einem nicht geimpften, in der gleichen Weise wie bei dem Versuch mit Gelatine gefüllten Reagensglas zeigte jedoch, daß ohne Zweifel eine Einwirkung der Hefe auf die Gelatine stattgefunden hatte. Diese war auch nach $1^1/_2$ Monaten von der Hefe vollkommen verflüssigt worden.

Rasse II verflüssigt viel rascher, Rasse XII etwas langsamer als *Levure anamite*.

VIII. Glykogengehalt der Zellen.

Der Glykogengehalt der Zellen von *Levure anamite* war in den zahlreich gemachten Beobachtungen höchstens mäßig. In gehopfter Würze bei 25° C herangezüchtete Hefe zeigte nach 7 Stunden noch keine Spur von Glykogen, nach 15 Stunden war die Reaktion mit Jod meist noch sehr schwach, nach 20 Stunden teilweise schon ziemlich deutlich, bis sie nach 2 Tagen ihren Höhepunkt erreichte. Nach 7 Tagen war der Glykogenvorrat nur noch sehr gering. In älteren Hefenkulturen reagierten fast nur mehr die starkwandigen und stark granulierten Zellen auf Glykogen, soweit sie sich oberhalb der Flüssigkeitsoberfläche an der Wandung des Kulturgefäßes (im „Hefenring“) angesiedelt hatten. Während die Zellen des Oberflächenbelages der Riesenkolonien mit Ausnahme der Dauerzellen, welche stets eine stärkere Glykogenreaktion zeigten, schwache Reaktion gaben, fehlte diese bei den Zellen der Anhänge entweder vollständig, oder sie wies nur auf Spuren von Glykogen hin.

Bei Rasse II und Rasse XII war der Glykogengehalt merklich größer als bei *Levure anamite*.

D. Zusammenfassung.

Die in den Amylobrennereien verwendete, als *Levure anamite* bezeichnete Hefe ist ein obergäriger Saccharomycet und zwar aus der Gruppe der wilden Hefen. Zellen der Gärungsform meist oval, doch auch kugelförmig. Glykogengehalt mäßig. Lichtbrechungsvermögen und Beschaffenheit des Zellinhaltes in den vegetativen Zellen wie bei wilden Hefen. Riesenzellen nicht selten. Dauerzellen. Zellgröße 4,0 : 4,0 μ bis 9,6 : 11,2 μ. Sproßverbände mit wenigen Gliedern. Kronenbildung, häufig in Zuckerlösungen sowie in Kartoffel- und Weißrübenwasser. In Hautbildungen neben ovalen und rundlichen Zellen auch langgestreckte wurstförmige bis zu 12,8 : 4,0 μ Größe. Auch hier Sproßverbände meist mit wenigen Gliedern. Anhänge der Riesenkolonien mit weitverzweigten Sproßverbänden langgestreckter wurstförmiger Zellen. Wachstumserscheinungen in Tröpfchenkulturen im allgemeinen mit denjenigen wilder Hefen übereinstimmend. Aussehen der Sporen wie bei wilder Hefe, kugelförmig, 1—4; Größe 2,4 μ bis 4,0 μ. Optimum der Sporenbildung 33° C (9 Stunden), Maximum 35° C (12 Stunden), Minimum 12° C (50 Stunden). Sporenbildungsvermögen im allgemeinen nicht stark ausgeprägt. Auskeimen der Sporen nach Typus I. Hautbildung nach Typus IIa. Auftreten einer „ersten Generation der echten Hautzellen". Optimum der Hautbildung auf Würze 31° C. Einzellkolonien in Würzegelatine nach Typus I und II. Riesenkolonien nach Typus Ia. Generationsdauer bei 26° C 2 Stunden, Vermehrung also relativ langsam.

Vergärt und assimiliert Dextrose, Lävulose, Galaktose, Saccharose, Maltose und Raffinose. Milchzucker wird nur assimiliert. Gärverlauf in Würze sehr langsam, in Maismaische energischer. In dieser Vergärungsgrad hoch. Obere Wachstumsgrenze in Hefenzuckerwasser, Hansenlösung, Weißrüben- und Weißkrautwasser zwischen 39,5° C und 41,6° C, in Würze, Gelbrüben- und Kartoffelwasser zwischen 41,6° C und 43° C. Abtötungstemperatur beim Erhitzen in verschiedenen Flüssig-

keiten meist zwischen 54 °C und 56 °C. Grenzwerte für die Entwicklungsfähigkeit in Nährlösungen mit Alkoholzusatz zwischen 1,8 % bei Amylalkohol und 15—27 % bei Methylalkohol. Grenzwerte für die Abtötung sämtlicher Zellen durch Alkohole entsprechend zwischen 2,5 % und 33 %. Verflüssigungsvermögen von Gelatine gering.

Nach einem Vergleich mit den bis jetzt genauer beschriebenen Hefen ergibt sich, daß die mit *Levure anamite* bezeichnete Hefe eine neue Art darstellt. Sie soll Saccharomyces anamensis genannt werden.

Literatur.

1. Brefeld, Abhandlungen d. Gesellsch. naturf. Freunde in Berlin am 19. Febr. 1878.
   Botanische Untersuch. über Schimmelpilze. Heft IV, 1881, S. 36.
2. Delbrück, Zeitschrift für Spiritus-Ind. 1894, Erg. H. S. 24.
3. Hansen, E. Chr., Compt. rend. du Lab. de Carlsberg, 1883, Bd. 2, S. 13.
4. „ „ Ebenda, Bd. 3, 1891, S. 44.
5. Hanzawa, Mykologisches Zentralblatt 1912, **I**, S. 76.
6. Henneberg W., Zeitschr. f. Spir. Ind. 1903, **26**, S. 91.
7. Hoffmann, Mitteilg. d. deutsch. Gesellsch. für Natur- u. Völkerkunde Ostasien, **I**, 1874, H. 6.
8. Hoyer D. P., Allgem. Zeitschr. für Bierbrauerei und Malzfabrikation 1900, **28**, S. 37.
9. Klöcker A., Compt. rend. du Lab. de Carlsberg, 10me Volume, 1911, 1re Livraison, S. 99.
10. Korschelt O., Mitteilg. d. deutsch. Gesellsch. für Natur- und Völkerkunde Ostasien **2**, 1876, H. 16.
11. Lindner P., Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben. 5. Aufl., 1909, S. 230.
12. „ „ Ebenda, S. 275.
13. „ „ und Saito, Wochenschrift für Brauerei 1910, **27**, 510 und 1911, **28**, S. 560.
14. „ „ Ebenda, 1912, **29**, S. 1.
15. Maercker-Delbrück, Handbuch d. Spiritusfabrikation 9. Aufl. 1908, S. 170.
16. Prazmowski, Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bakterienarten. Leipzig 1880.
17. Saare O., Zeitschr. f. Spir. Ind. 1895, Nr. 14.
18. Steuber, Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen, 1900, **23**, S. 9.
19. Vuillemin, Ber. d. deutsch. Botan. Gesellsch. **28**, 547.
20. Wehmer C., Zentralbl. für Bakt. II, 1900, **6**, S. 353.
    „ „ Ber. d. deutsch. Botan. Gesellsch. **28**, S. 547.
22. Will H., Anleitung zur biolog. Untersuchung usw. München 1909, S. 51.
23. „ „ Ebenda, S. 62.
24. „ „ „ S. 99 u. f.
25. „ „ „ S. 83 u. f.
26. „ „ „ S. 108 u. f.
27. „ „ „ S. 109.

Erklärung der Tafel I.

Rhizopus Delemar.

Sämtliche Zeichnungen sind mit dem Abbéschen Zeichenapparat hergestellt. Vgr. 40/1 (Sporen 440/1). Fig. 1—12 Kulturen auf Würzegelatine, Fig. 13—16 desgl. auf Kartoffeln, Fig. 17 desgl. auf Gelbrüben.

Fig. 1. Mehrfache Verzweigungen von Sporangienträgern, von einem Hauptstamm ausgehend.
a) Freigelegte Columellen, umgeben von Sporenhaufen.
b) Basalkragen, meist sehr kurz.

Fig. 2, 3. Teile von Sporangienträgern, mit Chlamydosporen.

Fig. 4, 5, 6, 7. Blasenförmige Anschwellungen der verzweigten Sporangienträger mit kurzgestielten Sporangien und Rhizoiden (c).

Fig. 8. Sporangienträgerverzweigung mit langen Trägern.

Fig. 8a. Apophyse nach Abstossung von Sporangium und Columella.

Fig. 9. Langgestielte Sporangien mit Rhizoiden (c) an den Trägern.

Fig. 10, 11. Rhizoide.

Fig. 11. Sporangien im Verlaufe eines Stolons, deren Träger kurz nach der Ursprungsstelle des Stolons aus diesem hervorgehen.

Fig. 13. Sporangienträger mit Rhizoiden (c).

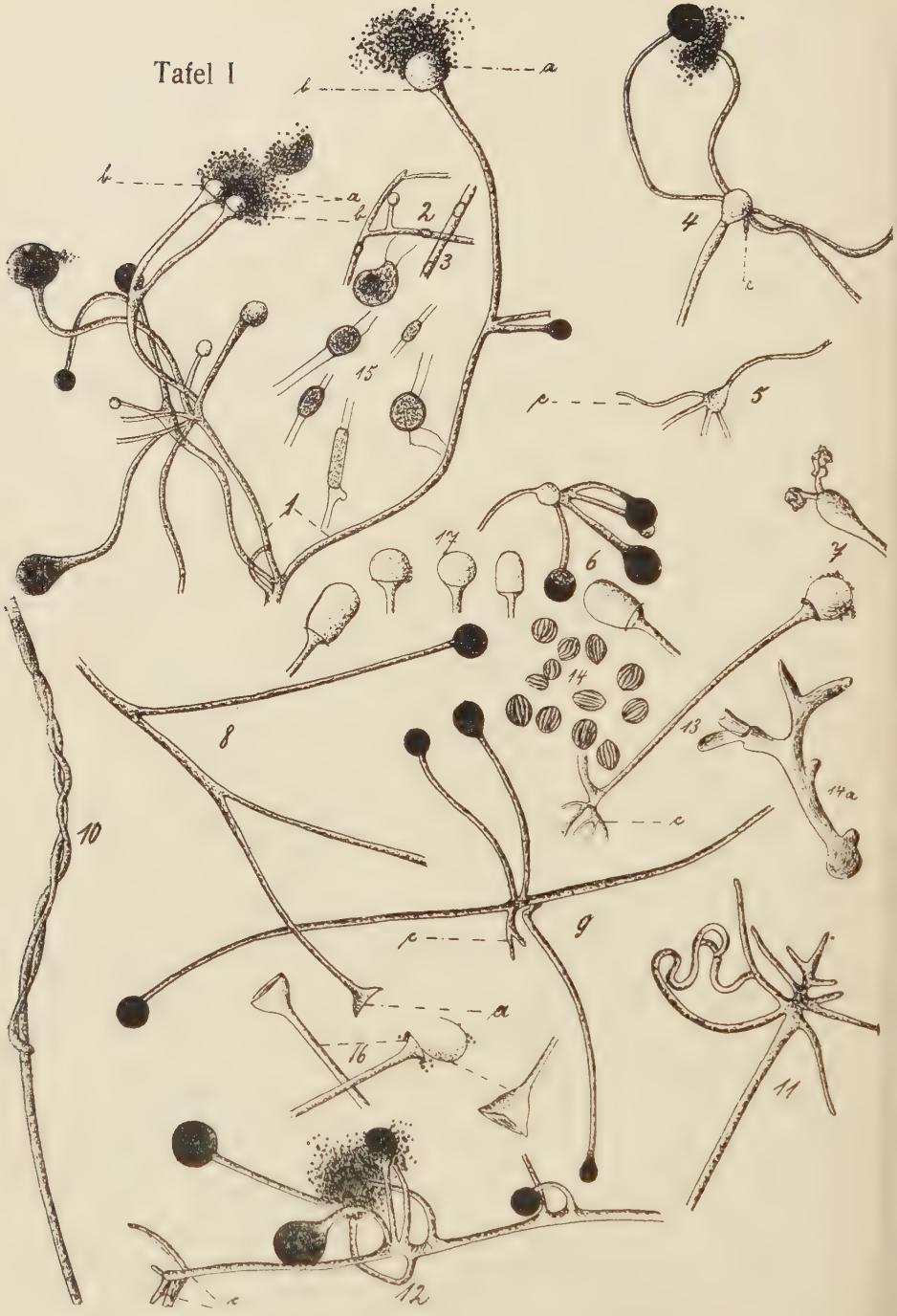
Fig. 14. Sporen mit deutlich sichtbarem, gefaltetem Epispor.
a) Keimende Spore.

Fig. 15. Gemmen oder Chlamydosporen.

Fig. 16. Apophysen, bezw. teilweise sehr regelmäßig abgestoßene Columellen.

Fig. 17. Verschieden geformte Columellen, zwei davon mit deutlichem Basalkragen.

Tafel I



Erklärung der Tafel II.

Levure anamite.

Sämtliche Zeichnungen sind mit dem Abbéschen Zeichenapparat hergestellt. Vgr. 540/1.

Fig. 1. Reife Sporen nach 20 Stunden bei 25° C. Bei a Sporenanlagen.
Fig. 2. a) Keimende Sporen in Tröpfchenkulturen mit gehopfter Würze nach 22 Stunden. b) Spore kurz vor dem Auskeimen.
Fig. 3. Zellen aus den Hautinselchen einer 2 Wochen alten Würzekultur.
Fig. 4. 3 Tage alte Kultur in gehopfter Würze bei 25° C.
Fig. 5. Hefering einer 2 Monate alten Kultur in Kartoffelwasser bei 20—24° C.
Fig. 6. $3^1/_2$ Monate alte, verflüssigte Stichkultur bei 18° C.
Fig. 7. $3^1/_2$ Monate alte, verflüssigte Stichkultur bei 18° C. a) Typische Dauerzellen. b) Dauerzellenähnliche Zellen. c) Riesenzelle als Dauerzelle mit Kronenbildung.
Fig. 8. 4 Wochen alte Riesenkolonie auf gehopfter Würzegelatine bei 20° C. Zellen aus der zentralen Partie.
Fig. 9. Wie vor. Zellen aus der Randpartie.
Fig. 10. Wie vor. Zellen aus den Anhängen.

Tafel II.

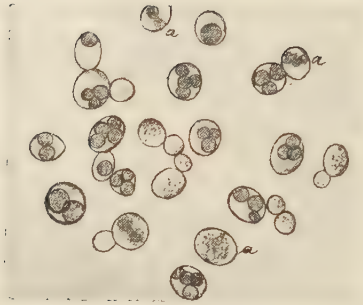
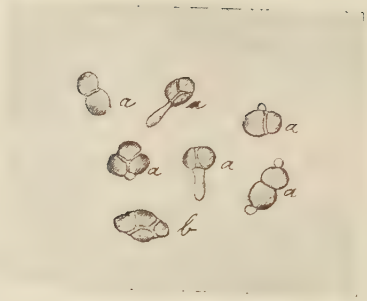


Fig. 1.



Fig, 2.

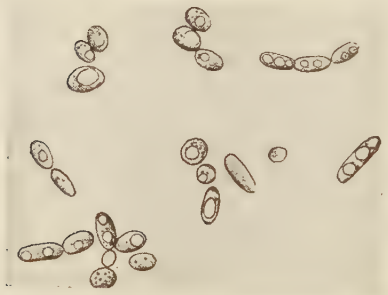


Fig. 3.

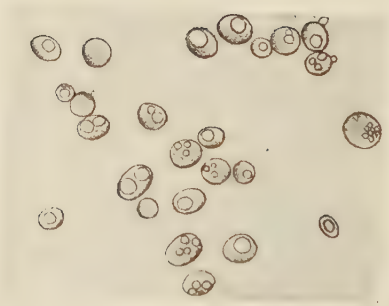


Fig. 4.

Fig. 5.

Tafel II. (Fortsetzung).

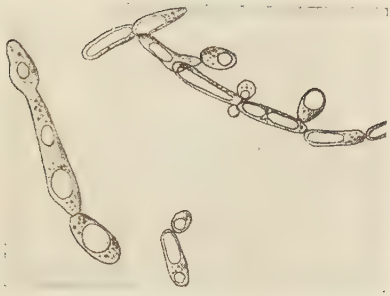


Fig. 6.

Fig. 7.

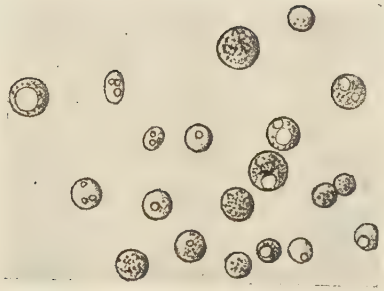


Fig. 8.

Fig. 9.

Fig. 10.

Erklärung der Tafel III.

Riesenkolonien von *Levure anamite*. Natürliche Größe.

Fig. 1. Ungehopfte Würzegelatine bei 20° C. Alter 5 Wochen.
Fig. 2. Gelbrübenwassergelatine „ „ „ „ „ „
Fig. 3. Weißrübenwassergelatine „ „ „ „ „ „
Fig. 4. „ „ „ „ 14° „ „ 10 „
Fig. 5. „ „ „ „ 9° „ „ 3 Monate.
Fig. 6. Weißkrautwassergelatine bei 14° C. Alter 10 Wochen.
Fig. 7. Hefenwassergelatine „ 20° „ „ 5 „
Fig. 8. Weißkrautwassergelatine „ 20° „ „ „ „
senkrechter Schnitt durch die Riesenkolonie; die äußerst kräftig entwickelten Anhänge zeigen sich hier sehr deutlich.

Tafel III.

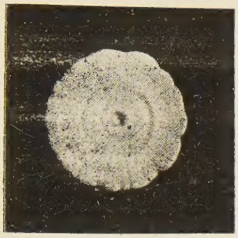


Fig. 1.

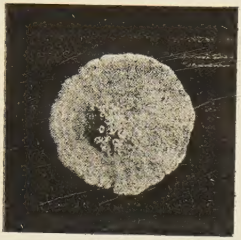


Fig. 2.

Fig. 3.

Fig. 4.

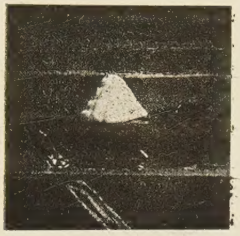


Fig. 5.

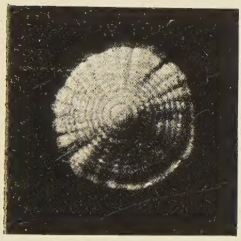


Fig. 6.

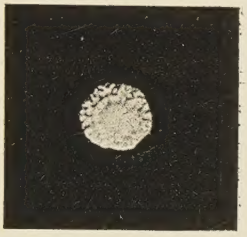


Fig. 7.

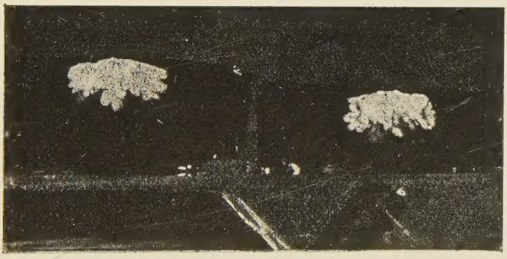


Fig. 8.

Berichtigung:

S. 38, 10. Zeile v. o., **35**°C statt **45**°C.
S. 43, 7. „ v. u., 20—**23**°C statt 20—**30**°C.
S. 44, 10. „ v. o., **mit** gleichmäßiger etc. statt **in** gleichm. etc.
S. 60, 5. „ v. o., **bis** auf 2,4°B statt **ist** auf 2,4°B.
S. 60, 16. „ v. o., 36—**38**°C statt 36—**28**°C.